

RAFAEL RAMOS CAIADO

**ANÁLISE E APLICABILIDADE DO CORANTE COMPOSTO POR
ANTOCIANINAS DO FRUTO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM
CROMOVITRECTOMIA EM HUMANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Doutor em Ciências pelo
Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia.

São Paulo

2019

RAFAEL RAMOS CAIADO

**ANÁLISE E APLICABILIDADE DO CORANTE COMPOSTO POR
ANTOCIANINAS DO FRUTO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM
CROMOVITRECTOMIA EM HUMANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Doutor em Ciências pelo
Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Maia

Coorientador: Prof. Acacio Souza Lima-Filho

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ramos Caiado, Rafael

Análise e Aplicabilidade do Corante Composto por Antocianinas do
Fruto do Açaí (*Euterpe oleracea*) em Cromovitrectomia em Humanos /
Rafael Ramos Caiado. - São Paulo, 2019.
xv, 77f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista
de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia.

Título em inglês: Analysis and Applicability of the Dye Composed of
Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) in
Chromovitrectomy in Humans.

1. Retina. 2. Cromovitrectomia. 3. Açaí (*Euterpe oleracea*). 4.
Antocianinas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Mauro Silveira de Queiroz Campos

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Augusto Paranhos Jr

RAFAEL RAMOS CAIADO

**ANÁLISE E APLICABILIDADE DO CORANTE COMPOSTO POR
ANTOCIANINAS DO FRUTO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM
CROMOVITRECTOMIA EM HUMANOS**

Presidente da banca:

Prof. Dr. Mauricio Maia

BANCA EXAMINADORA

- | | |
|----|-------|
| 1. | _____ |
| 2. | _____ |
| 3. | _____ |
| 4. | _____ |

*Dedico esse estudo à minha esposa, **Ana Carolina**, pela parceria de sempre, pelo apoio incondicional, por ser um exemplo de mãe e com quem amo compartilhar a vida. Às minhas filhas, **Marina** e **Gabriela**, meus amores.*

Agradecimentos

Aos meus pais, **Dr. Roberto Caiado** e **Sra. Dalva Procópio**, por me passarem os mais importantes fundamentos da vida e por cultivarem valores que se tornaram os alicerces na formação do meu caráter.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mauricio Maia**, meu respeito, minha admiração e meu sincero agradecimento pela oportunidade de confiar a mim este estudo em 2014. Você foi o motor de todo esse processo e é com grande orgulho que divido esta obra. Obrigado pelo exemplo de energia e por seu otimismo que acompanharam cada passo dessa caminhada.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Acácio Alves de Souza Lima-Filho**, pelo brilhantismo e por seus ensinamentos. Sua amizade e a oportunidade de trabalharmos juntos foram além das orientações prestadas, envolvendo análises laboratoriais e fracionamento do medicamento. Você é um exemplo de vida.

Minha querida parceira de estudo, **Cristiane Peris**, por sua dedicação e persistência.

Ao **Prof. Dr. André Maia**, pelo incentivo e oportunidade. Foi dele o convite para a UNIFESP. Ao **Prof. Dr. Eduardo Rodrigues**, pela amizade e pelos ensinamentos. À **Profa. Dra. Sung Eun Song Watanabe** e à **Profa. Dra. Rita Sinigaglia Coimbra**, pelos ensinamentos em eletrofisiologia ocular e em microscopia.

Aos colegas oftalmologistas, **Dr. Emmerson Badaró** e **Dr. Eduardo Novais**, pela amizade e parceria desde os meus primeiros passos iniciados em um bate-papo no centro cirúrgico até a conclusão do último estudo.

À **Universidade Federal de São Paulo** e ao **Departamento de Oftalmologia**, meu mais sincero agradecimento pela acolhida tanto como pós-graduando quanto como preceptor cirúrgico, pelas oportunidades geradas, pelo crescimento profissional e pela infraestrutura física e intelectual concedidas para a realização deste e de outros projetos.

A **todos os pacientes e seus familiares** envolvidos nesta linha de pesquisa, meu muito obrigado pela confiança e pelo respeito que sempre pautaram nossas relações, bem como pelas amizades que dali floresceram.

Esta tese deu origem às seguintes publicações:

1. Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): A potencial novel vital dye for chromovitrectomy. J Ophthalmol. 2018;2018:6830835.
2. Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais EA, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SE, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in Rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. Curr Eye Res. 2017;42(8):1185-93.
3. Caiado RR, Peris C, Rodrigues EB, Farah ME, Maia A, Magalhães O Jr, Novais E, Lima-Filho AS, Maia M. A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019 Jan 3. doi: 10.1007/s00417-018-04204-y. [Epub ahead of print].

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas	x
Lista de siglas e abreviaturas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	6
3 ARTIGOS	8
3.1 Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (<i>Euterpe oleracea</i>): a potential novel vital dye for chromovitrectomy.....	8
3.2 Retinal toxicity of Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans.....	18
3.3 A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results.	29
4 DISCUSSÃO.....	44
4.1 Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>): a Potencial Novel Vital Dye for Chromovitrectomy.....	44
4.2 Retinal Toxicity of Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans.....	46
4.3 A New Dye Based on Anthocyanins from the Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) for Chromovitrectomy in Humans: Clinical Trial Results	50
4.4 Perspectivas Futuras	53
5 CONCLUSÕES	55
5.1 Considerações finais	55
6 REFERÊNCIAS	57
ANEXOS.....	61
Bibliografia consultada	78

Lista de figuras

- Figura 1.** Estrutura molecular básica das antocianinas45
- Figura 2.** Sumário de todo o sistema utilizado para realização da eletrorretinografia. Os três eletrodos estão em destaque e posicionados à direita do coelho - A. eletrodo estimulador posicionado na córnea do animal; B. eletrodo negativo posicionado periocular; C. eletrodo terra posicionado na orelha do animal.....47
- Figura 3.** Achados retinianos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) 24 horas e 7 dias nos olhos controle e após injeção intravítrea do corante a 35% do corante à base do fruto do açaí. Diferentes camadas retinianas mostradas para representar os olhos controle e após 24 horas e 7 dias. Vinte e quatro horas após a injeção intravítrea, há um discreto edema de células ganglionares e desarranjo mitocondrial (B). A presença de corpos multilamelares mais proeminentes com 7 dias (C-seta). Na camada nuclear interna, observa-se danos nos feixes nervosos (E -asterisco), alteração mitocondrial (E e F - Cabeça da seta) e abundantes corpos multilamelares (F - seta). Ausência de anormalidades observadas na camada nuclear externa (H, I). Os segmentos internos e externos dos fotorreceptores não apresentaram anormalidades relevantes, mas houve um desarranjo na crista mitocondrial no segmento interno dos fotorreceptores com 24 horas (K - seta larga), sendo observado com menor expressão com 7 dias (L - seta larga)48
- Figura 4.** Questionário, tabela e gráfico com perguntas e respostas dos cirurgiões após procedimentos usando o corante extraído do açaí.....52

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Quantificação das antocianinas com base no tempo de retenção da área, o qual foi analisado por CLAE nas diferentes concentrações46
- Tabela 2.** Descrição e análise comparativa (Kruskal-Wallis) da eletrorretinografia de campo total em coelhos, após 7 dias da injeção intravítrea de SSB nos olhos controle e de diferentes concentrações do corante do Açaí nos olhos testados47

Lista de siglas e abreviaturas

AFG	Angiofluoresceinografia ou angiografia fluoresceínica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBG	Brilliant Blue G (em português, azul brilhante G)
BM	Buraco macular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
EMD	Edema Macular Diabético
EPM	Escola Paulista de Medicina
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ERG	Eletrorretinografia
ICG	<i>Indocyanine Green</i> (em português, indocianina verde)
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
LM /ML	<i>Light microscopy</i> (em português, microscopia óptica)
MER	Membrana epirretiniana
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MLI	Membrana Limitante Interna
mOsm	Miliosmol
MS	<i>Mass spectrometry</i> (em português, espectrometria de massa)
OCT/TCO	<i>Optical Coherence Tomography</i> (em português, tomografia de coerência óptica)
PIO	Pressão Intraocular
SSB	Solução Salina Balanceada
TEM /MET	<i>Transmission electron microscopy</i> (em português, microscopia eletrônica de transmissão)
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

Resumo

Objetivo: Caracterizar e quantificar as antocianinas do corante extraído do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*), avaliar sua segurança em um modelo animal e testar sua aplicabilidade em cromovitrectomia em humanos. **Métodos:** No estudo 1, amostras de três concentrações de 10%, 25% e 35% do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*), equivalentes a 100 mg, 250 mg e 350 mg de amostras liofilizadas, foram diluídas em 1 ml do tampão fosfato para obter um pH de 7 e uma miliosmolaridade de 300 mOsm. Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta *performance* (CLAE), com base na espectrometria de massa de antocianinas obtidas previamente, para caracterizar e quantificar as antocianinas presentes no novo corante. No estudo 2, 18 coelhos receberam injeções intravítreas com as concentrações de 10%, 25% e 35% do corante do açaí. Olhos controle receberam solução salina balanceada (SSB). Foram realizados, antes das aplicações, após 24 horas e depois de 7 dias, análise da eletrorretinografia (ERG), retinografia, angiofluoresceinografia (AFG), tomografia de coerência óptica (OCT), microscopia óptica (LM) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). No estudo 3, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo e do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) para o protocolo do estudo clínico das fases I/II, 25 pacientes foram selecionados. **Critérios de inclusão:** pacientes diagnosticados com buraco de mácula idiopático, de ambos os sexos, maiores de 18 anos. **Critérios de exclusão:** glaucoma prévio, uveíte ativa, outras condições oculares exceto buraco de mácula que poderiam afetar ou limitar resultados pós-operatórios. **Técnica cirúrgica:** Todos os pacientes foram operados pela técnica de vitrectomia padrão, utilizando quatro esclerotomias e um sistema de 23-*gauge* com iluminação acessória. Pacientes fácicos foram submetidos à cirurgia de facoemulsificação com implante de lente intraocular, seguido por descolamento da hialoide posterior e *peeling* (remoção) da Membrana Limitante Interna (MLI) e guiado pelo corante do açaí a 25%. Imediatamente após os procedimentos, um questionário sobre a habilidade de o corante pigmentar a hialoide posterior e a MLI foi entregue aos dez cirurgiões que realizaram as 25 cirurgias. A toxicidade do corante foi analisada por exames anatômicos e funcionais antes da cirurgia e nos dias 1, 30 e 180. A análise anatômica dos olhos testados incluiu acuidade visual, tonometria, biomicroscopia, fundoscopia, retinografia, AFG, OCT e angiotomografia por coerência óptica. A análise funcional foi realizada com ERG. Foram usados o teste *t-student* e a análise de

variância (ANOVA) com medidas repetidas, e os valores de $p < 0,05$ foram significantes.

Resultados: Estudo 1 mostrou a presença de cinco moléculas diferentes de antocianinas independentemente da concentração do corante do açaí, na seguinte proporção: cianidina-3-O-glucosídeo > homoorientina > orientina > taxifolina > isovitexina. No estudo 2, em coelhos, a retinografia, com 24 horas, mostrou uma elevada opacidade vítrea com o aumento da concentração do corante. AFG e OCT não revelaram toxicidade em nenhuma das concentrações. ERG apresentou amplitudes reduzidas para onda-b em todas as concentrações comparada com a análise *baseline*. As medianas das amplitudes da onda-b diminuíram sem significância e a latência aumentou para as concentrações de 10% e 25%. Esses achados foram significantes para a concentração de 35%. LM e MET não mostraram anormalidades para 10% e 25%. MET, na concentração de 35%, revelou edema de células ganglionares em 24 horas com melhora em 7 dias. Vacuolização, corpos multilamelares e danos de feixes nervosos ocorreram em 24 horas e em 7 dias na camada nuclear interna. A ruptura da crista mitocondrial surgiu no segmento interno dos fotorreceptores em 24 horas, mas regrediu após 7 dias. No estudo 3 (em humanos), independentemente dos períodos testados, não foram identificados anormalidades funcionais nem anatômicas. Os resultados anatômicos mostraram uma taxa de fechamento de mácula em 19 dos 25 olhos operados. Todos os cirurgiões relataram que o corante na concentração de 25% pigmentou a hialoide posterior e a MLI com uma cor roxa. Os resultados do estudo clínico nas fases I/II, após seis meses, mostraram que o corante foi útil e seguro na identificação da hialoide posterior e do *peeling* da MLI em cromovitrectomia em humanos. **Conclusões:** O corante extraído do fruto do açaí é principalmente composto por antocianina cianidina-3-O-glucosídeo. O corante do açaí nas concentrações de 10% e 25% foi usado com segurança em coelhos. Após seis meses, os resultados clínicos em humanos (fases I/II) revelaram que o novo corante, com base nas antocianinas do fruto do açaí na concentração de 25%, foi seguro e eficiente para ser usado na identificação da hialoide posterior e da MLI durante a cirurgia vitreoretiniana em humanos. Esse corante roxo pode ser uma alternativa para a cromovitrectomia e estudos adicionais são necessários.

Abstract

Purpose: This study aimed to analyze the anthocyanin content and test the applicability of a novel dye extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) in chromovitrectomy in humans. **Methods:** Ophthalmos Pharmaceutical Industry S/A (São Paulo, Brazil) developed three concentrations of the acai dye (10%, 25% and 35%) equivalent to 100, 250 and 350 mg of lyophilized acai pulp samples that were diluted in 1 ml of phosphate buffer solution (pH 7 and 300 mOsm). In the first study, the lyophilized acai pulp samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using cyaniding 3-O-glucoside, hemoorientin, and orientin and mass spectrometry (MS) to identify and compare color dye distinctions. Mass spectrometry was used to identify and compare the dye concentrations for five isolated basic anthocyanin molecules. In study 2 rabbits were injected intravitreally with 10%, 25% and 35% concentrations of the acai dye. Control eyes received balanced salt solution (BSS). Electroretinogram (ERG), fundus imaging, fluorescein angiography (FA), optical coherence tomography (OCT), light and transmission microscopy (LM/MET) were performed. In study 3 the ethics committee of the Federal University of São Paulo and the National Council of Research (CONEP) approved the study protocol of a phase I/II clinical trial in 25 human eyes. **Inclusion criteria:** Patients diagnosed with idiopathic macular hole, of both genders, older than 18 years. **Exclusion criteria:** previous glaucoma, active uveitis, ocular conditions other than macular holes that could affect or limit the postoperative results and previous ocular surgeries other than uncomplicated cataract. **Surgical technique:** twenty-three-gauge four-port PPV + phacoemulsification (if phakic eyes) followed by both posterior hyaloid detachment and ILM peeling guided by 25% acai fruit dye staining as well as perfluoropropane injection and 5 day prone positioning. A questionnaire about the ability of the dye to stain the posterior hyaloid and ILM was given to the 10 surgeons that performed the 25 surgeries immediately after the procedures. Dye toxicity was analyzed by anatomic and functional examinations before surgery and at days 1, 30 and 180. The anatomic analysis of tested eyes included best-corrected visual acuity, tonometry, biomicroscopy, funduscopy, fundus imaging, FA, OCT and optical coherence tomography angiography. Functional analysis was performed by ERG. Student's *t* test and Analysis of Variance (ANOVA), with repeated measures, was used and *p*-values <0.05 were significant. **Results:** Study 1 showed the presence of five

different anthocyanin molecules in all three concentrations of the acai dye: cyanidin-3-0-glucoside > homoorientin > orientin > taxifolin > isovitexin. In study 2, using a rabbit model, fundus imaging showed increased vitreous opacity with increased dye concentrations. FA and OCT showed normality in all concentrations. Comparison between BSS and dye concentrations were analyzed using Kruskal-Wallis and Mood's median test ($p < 0.05$). At 24h, ERGs showed reduced amplitudes from baseline in all eyes. Median b-wave amplitudes nonsignificantly decreased and latency increased with 10% and 25%; findings were significant ($p < 0.05$) for 35%. LM and TEM showed no abnormalities for 10% and 25%. With 35%, TEM showed ganglion cell edema at 24 h that resolved after 7 days. Vacuolization, multilamellar bodies, and nerve bundle damage occurred at 24 h/7 days in the inner nuclear layer. Mitochondrial cristae disruption occurred in the inner photoreceptor segment at 24 h that decreased by 7 days. In Study 3 (clinical trial in humans) showed no abnormalities after both anatomical and functional analysis independent on the tested times. The anatomical outcomes showed a closure rate of 19 out of 25 operated eyes. All surgeons reported that the acai fruit dye at a 25% concentration stained the posterior hyaloid detachment and the ILM with a purple color. **Conclusions:** The acai dye extracted from the acai fruit is mainly composed of the anthocyanin cyanidin-3-0-glucoside. The acai dye in the concentrations of 10% and 25% were safe in rabbits. Six months results of a phase I/II trial showed that the new dye based on the anthocyanins from the acai fruit in a 25% concentration was safe and useful for identifying both posterior hyaloid and ILM during vitreoretinal surgery in humans. This purple dye may be an alternative to chromovitrectomy and additional studies are necessary.

1 INTRODUÇÃO

Envolvendo técnicas complexas e delicadas, a cirurgia vitreoretiniana trata de doenças, como o buraco macular (BM), a membrana epirretiniana (MER) e o edema macular diabético (EMD).^(1,2) A cromovitrectomia é uma dessas técnicas que incluem o uso de corantes compostos de pigmentos vitais ou cristais para melhorar a visibilização durante a cirurgia de vitrectomia. Uma boa impregnação do corante favorece o resultado cirúrgico por facilitar procedimentos, como a remoção cirúrgica da membrana limitante interna (MLI) e a MER, além da remoção vítrea completa.⁽³⁻⁵⁾

Os corantes são compostos químicos que se agregam a várias substâncias *in natura* para produzir cor.⁽⁶⁾ Quando os corantes tingem tecidos ou células vivas, são chamados de corantes vitais.⁽⁷⁾ Os corantes atualmente mais utilizados em cirurgia vitreoretiniana, a indocianina verde (ICG) e o azul brilhante G (BBG), facilitam a identificação e a remoção da membrana limitante interna.⁽⁸⁾

A ICG tem importante papel como pioneira para remoção da MLI. No entanto, devido seu conhecido perfil de toxicidade, a recomendação atual para cromovitrectomia é a não utilização da ICG, especialmente na cirurgia de buraco macular.⁽⁹⁻¹¹⁾

O BBG é um corante sintético que foi certificado como corante alimentar na Europa e pode ser usado como marcador do coração e dos vasos sanguíneos e de proteínas em doenças neurológicas.⁽¹²⁾ Dados sobre a utilização do BBG para cromovitrectomia e cirurgia de catarata foram primeiramente publicados em 2006.⁽¹³⁾ Exceto pelos Estados Unidos, é o corante mais utilizado na atualidade para a pigmentação da MLI. No entanto, o uso *in vitro* do BBG revelou toxicidade celular dose-dependente.⁽¹⁴⁾ Apesar da boa afinidade do BBG pela MLI em olhos humanos, a migração inadvertida sub-retiniana do corante em um procedimento de remoção da MLI resultou em “defeitos em janela” na angiofluoresceinografia, sugerindo anormalidades atróficas do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR).⁽¹⁵⁾

O acetato de triancinolona, livre de preservantes e micronizado, possibilita a identificação do vítreo através da deposição de cristais e é um dos corantes mais seguros empregados atualmente.⁽¹⁶⁾ Os corantes azul trypan e o azul patente são outras opções de corantes usados em cromovitrectomia. Enquanto o acetato de triancinolona é limitado a deposição na hialoide posterior/vítreo, o azul trypan e azul patente pigmentam MERs mas possuem afinidade limitada para MLIs.⁽¹⁷⁾

Até o momento não há um corante estabelecido como ideal para ser utilizado em cirurgias vitreoretinianas. A busca por esse corante ideal tem como base um pigmento com baixo potencial oxidativo e uma capacidade pigmentar seletiva e efetiva em relação à MLI e/ou à MER, bem como tem a capacidade de se depositar sobre a hialoide posterior.⁽¹⁸⁾

O uso de corantes naturais foi sugerido como coadjuvante na visualização das estruturas pré-retinianas e de membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, *blueberries*, frutos do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das características das antocianinas é a de seu efeito antioxidante natural.^(19,20)

O fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) é originado de uma árvore nativa da floresta amazônica e tem sido amplamente distribuído em razão de suas excelentes propriedades nutricionais. É um alimento calórico, rico em proteínas, gorduras poli-insaturadas, carboidratos e antocianinas.⁽²⁰⁻²²⁾ As antocianinas presentes em sua composição são compostos reativos devido ao seu estado iônico, apresentando também uma grande sensibilidade a mudanças de temperatura e pH. O potencial antioxidante das antocianinas é dependente do número e posição dos grupo hidroxila e sua conjugação, assim como a presença de elétrons doadores no anel da estrutura, devido a capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desemparelhamento de elétrons.⁽²³⁾ Estudos anteriores mostraram que as antocianinas do açaí podem inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e a atividade das ciclooxygenases 1 e 2.⁽²⁴⁾ Também tem sido sugerido que essas moléculas, por serem antioxidantes, apresentam a capacidade de quelar o oxigênio singlete que é liberado após a irradiação do corante pela luz durante a cirurgia vitreoretiniana.^(25,26)

As antocianinas extraídas do fruto do açaí, quando ajustadas a uma concentração de 0,5%, a um pH de 7,06 e a uma osmolaridade de 304 mOsm, resultaram em uma solução de coloração roxa.⁽²⁷⁾ Ao ser testada durante a cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI, cuja pigmentação revelou-se arroxeadada.^(27,28) Esses estudos marcaram o início da linha de pesquisa atual que começou com a caracterização da composição de antocianinas presentes no pigmento extraído do açaí e terminou com a pesquisa clínica em humanos. O presente estudo também foi inovador pois é o primeiro a testar em humanos o uso de um corante natural isolado, típico da flora brasileira, em vitrectomia. Diante disso, a patente do uso intraocular das antocianinas do fruto do

açaí foi depositada como pedido nacional de Patente sob nº P11000244-8 A2 no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) com cessão de direitos para a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa atual foi testar a aplicabilidade do pigmento extraído do fruto do açaí para ser usado como corante em cromovitrectomia. A linha de pesquisa foi dividida em três estudos e incluiu uma etapa laboratorial, um estudo em coelhos e outro estudo clínico em humanos, com os seguintes objetivos:

- (1) Classificar e quantificar as antocianinas presentes no pigmento extraído do fruto do açaí nas concentrações 10, 25 e 35%.
- (2) Testar a toxicidade nas concentrações 10, 25 e 35% do corante extraído do fruto do açaí, usando um modelo em coelhos.
- (3) Avaliar clinicamente o perfil de segurança e a eficiência do corante na concentração de 25% para identificar a hialoide posterior e a MLI durante cromovitrectomia em humanos.

3 ARTIGOS

3.1 Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): a potential novel vital dye for chromovitrectomy.

Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Journal of Ophthalmology. 2018; 2018:6830835.

Research Article

Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): A Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy

Cristiane S. Peris,¹ Rafael R. Caiado,¹ Acácio Alves Souza Lima-Filho,^{1,2} Eduardo B. Rodrigues,¹ Michel Eid Farah,¹ Mariana Batista Gonçalves,¹ Bruno de Queiroz Alves,¹ Joao Guilherme Palma Urushima,¹ Raul Ragazzi,^{1,2} and Mauricio Maia^{1,3}

¹Department of Ophthalmology, Federal University of São Paulo, Botucatu Street, 816–Vila Clementino, 04023-062 São Paulo, SP, Brazil

²Ophthalmos S/A, Brigadeiro Luís Antônio Avenue, 4830–Jardim Paulista, 01401-002 São Paulo, SP, Brazil

³Brazilian Institute of Fight Against Blindness, Otto Ribeiro Avenue, 901–Jardim Paulista, 19814-470 Assis, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Mauricio Maia; maiamauricio@terra.com.br

Received 10 March 2018; Accepted 17 May 2018; Published 19 July 2018

Academic Editor: Anat Loewenstein

Copyright © 2018 Cristiane S. Peris et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Purpose. To classify and quantify anthocyanins in a vital dye extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*), adjust pH and osmolarity, and perform lyophilization to develop a new chromovitrectomy dye. **Methods.** Three dye concentrations 10%, 25%, and 35% (equivalent to 100, 250, and 350 mg of lyophilized acai fruit pulp extract samples) were evaluated when diluted in 1 ml of phosphate-buffered solution (pH 7 and 300 mOsm). The dye was analyzed by mass spectrometry and high-performance liquid chromatography (HPLC) to identify and quantify anthocyanins molecules. **Results.** The pH and osmolarity correction and lyophilization were performed without damaging the anthocyanin molecular structure. Mass spectrometry confirmed the presence of five anthocyanins in the three concentrations of the dye. Cyanidin-3-O-glucoside was the major anthocyanin found. HPLC showed that the concentration of anthocyanin was similar, independent of the dye concentration tested. **Conclusions.** Lyophilization and the correction of pH and osmolarity (7.00 and 300 mOsm, resp.) were performed successfully. Five anthocyanins are present in the dye from the acai fruit. The major anthocyanin is cyanidin-3-O-glucoside. Independent of the dye concentration tested, the anthocyanin concentration was similar. Standardized chemical characteristics of this new dye may allow its use during chromovitrectomy in humans.

1. Introduction

The acai fruit (*Euterpe oleracea*) from the palm tree is native to the Amazon forest in Brazil. In addition to being one of the main trees that produce palm hearts, the acai palm also produces a fruit with high nutritional properties and economic value for the food and cosmetic industries. The acai fruit has been described as caloric and rich in proteins, polyunsaturated fatty acids, and sugars (Table 1) [1].

Carotenoids and anthocyanins are among the main components of the acai fruit [2–4]. Anthocyanins, derived from the Greek words anthos (flower) and kianos (blue), are part of a large group of organic components known as

flavonoids that are represented by the basic chemical structure C6-C3-C6 (Figure 1). The phenolic structure of an anthocyanin provides an antioxidant effect due to electron donation or transference of hydrogen atoms.

It has been suggested that photosensitizing dyes used in chromovitrectomy could enhance phototoxicity by increasing levels of free radicals, creating a photoproduct that could be harmful to retinal cells. The antioxidant effects of anthocyanins theoretically could quench the singlet oxygen, which is released during chromovitrectomy [5–7]. The antioxidant property of the acai dye, associated with its high affinity for the internal limiting membrane (first observed in cadaveric eyes by our research team), became the basis for the development of a novel dye [8].

TABLE 1: Reference of nutritional values from 100 grams of acai fruit (*E. oleracea*) pulp on a diet of 2,500 kcal/day.

Protein	13 g
Iron	26 g
Fibers	34 g
Phosphorus	227 g
Sodium	56.4 g
Vitamin C	17 mg
Potassium	932 mg
Vitamin E	45 mg
Calcium	286 mg
Lipids	17 mg
Magnesium	174 mg
Glycides	36 mg
Calorie value	349 kcal

Source: Federal University of Para State, Brazil.

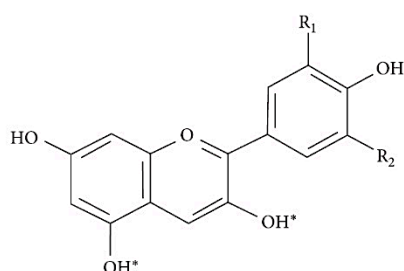


FIGURE 1: Basic molecular structure of the anthocyanins.

In 2017, our research group found that the 10% and 25% concentrations of the acai dye were safe when used in a rabbit model [9]. In this study, rabbits were injected intravitreally with the acai dye in three concentrations: 10%, 25%, and 35%. Control eyes received balanced salt solution. Functional evaluations were performed using electroretinography while morphologic examinations were performed by fundus imaging, fluorescein angiography, optical coherence tomography, light microscopy, and transmission electron microscopy. The 10% and 25% dye concentrations from the acai fruit did not cause significant functional or morphological toxicity. However, the 35% concentration showed evidence of morphologic and functional abnormalities suggestive of temporary toxic effects at 24 h follow-up.

Hence, the highest concentration of the acai fruit that was safe and effective in the rabbit model was 25%. This concentration was used for the sequence of a phase I/II clinical trial in 25 humans (unpublished data).

The objectives of the current study were to classify and quantify the anthocyanins of the acai fruit dye in the concentrations of 10%, 25%, and 35%. This information will become the basis for further understanding the antioxidant behavior of the acai dye.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Preparation. The commercial acai extract was divided into flasks of 100, 250, and 350 mg of lyophilized

TABLE 2: Gradient used for liquid chromatography analysis of five major anthocyanins.

Time	Phase A (%)	Phase B (%)	Flow (mL/minute)
0.0	95	5	1.00
5.0	95	5	1.00
20.0	5	95	1.00
25.0	95	5	1.00
27.0	95	5	1.00
35.0	95	5	1.00

anthocyanin powder to produce the concentrations of 10%, 25%, and 35%, respectively.

Ophthalmos SA (São Paulo, Brazil) developed the lyophilization process for the final dye preparation that was comprised mainly of anthocyanins. This process was performed in a sterile environment, stabilized at -50°C for 24 hours, and diluted in 1 ml of polyvinyl alcohol in the 10%, 25%, and 35% concentrations. The pH of the natural extract was acidic [10]. Hence, both the pH and osmolarity (pH 7.00; 300 mOsm) were controlled and established using one milliliter of phosphate-buffered solution (PBS). These concentrations also reflect the most suitable values obtained in preliminary studies in which factors such as staining capacity, pH, osmolarity, solubility, and stability were considered.

The lyophilized dye solutions were stored in depyrogenized amber flasks based on our previous results that anthocyanin molecules are highly unstable and light exposure might modify the staining capacity of the dye [9]. The anthocyanins were then analytically characterized by mass spectrometry.

2.2. Mass Spectrometry. Twenty-five-milligram samples of the raw materials and final products were subjected to mass spectrometry to compare the specific molecules in lower to higher quantities. This analysis was based on a spectral data bank. SGB Chemical Consultant Ltda. (São Paulo, Brazil), which was blinded to the dye components, analyzed the three lyophilized samples.

2.3. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Three microliters of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Vetec Ventiltechnik GmbH) and 7.0 mL of the solution from the mobile phase were added to the flasks with the dye concentrations. These were then put in an ultrasonic bath, and the extraction process continued for 10 minutes. The flasks were removed from the bath, and the solutions were filtered into 1.5 mL vials containing a filter 0.22 micrometer in diameter. Finally, 20 μL was added to the HPLC stabilized system.

The analysis was performed using the 1260 Infinity II liquid chromatography system and a diode array detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The specific methodology used a 5 μm 150 \times 4.6 mm Agilent Eclipse Column XDB C18 (Agilent Technologies). The mobile phase with an aqueous solution of 0.1% trifluoroacetic acid was referred to as phase A and acetonitrile HPLC was referred to as phase B.

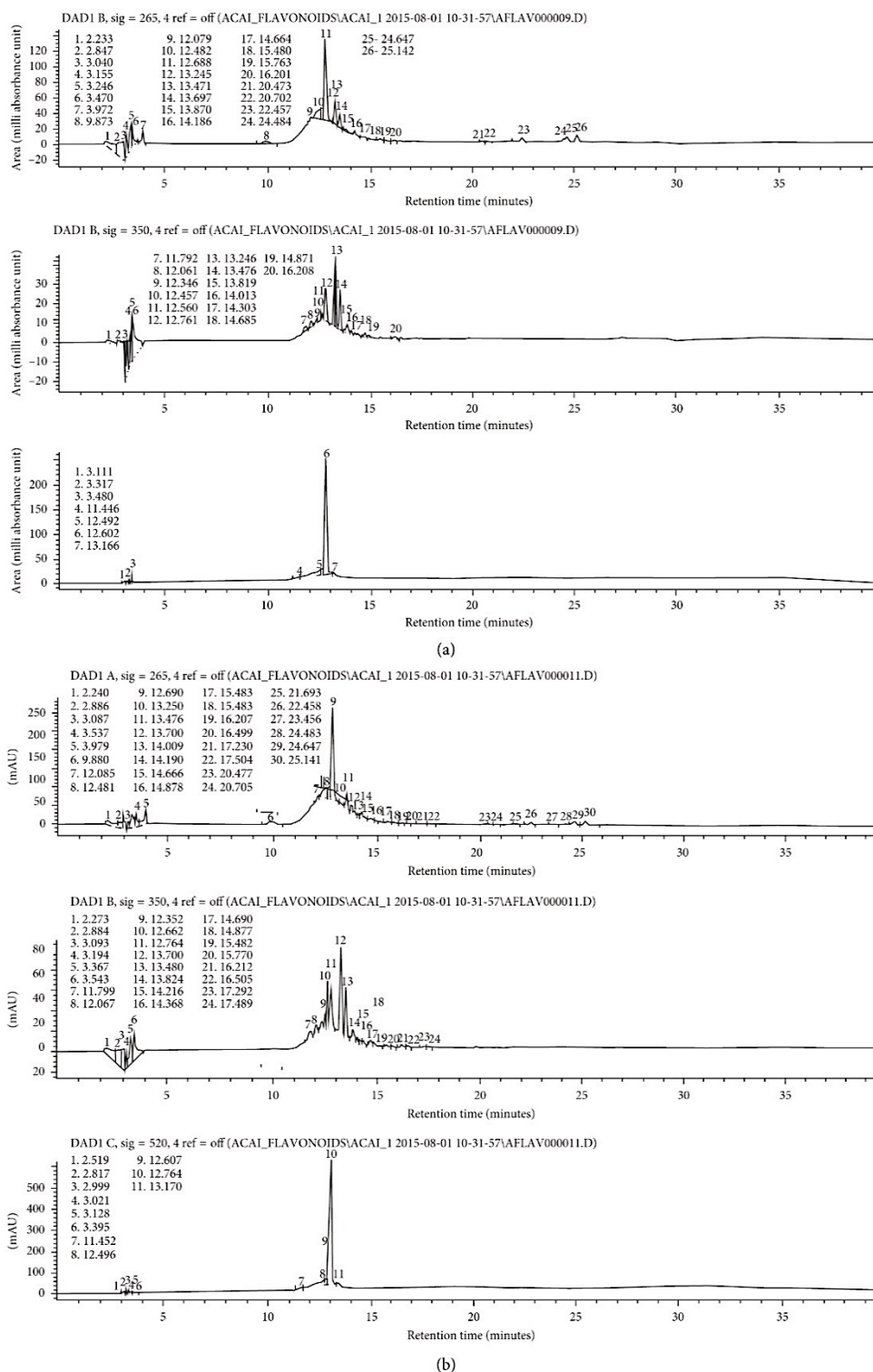


FIGURE 2: Continued.

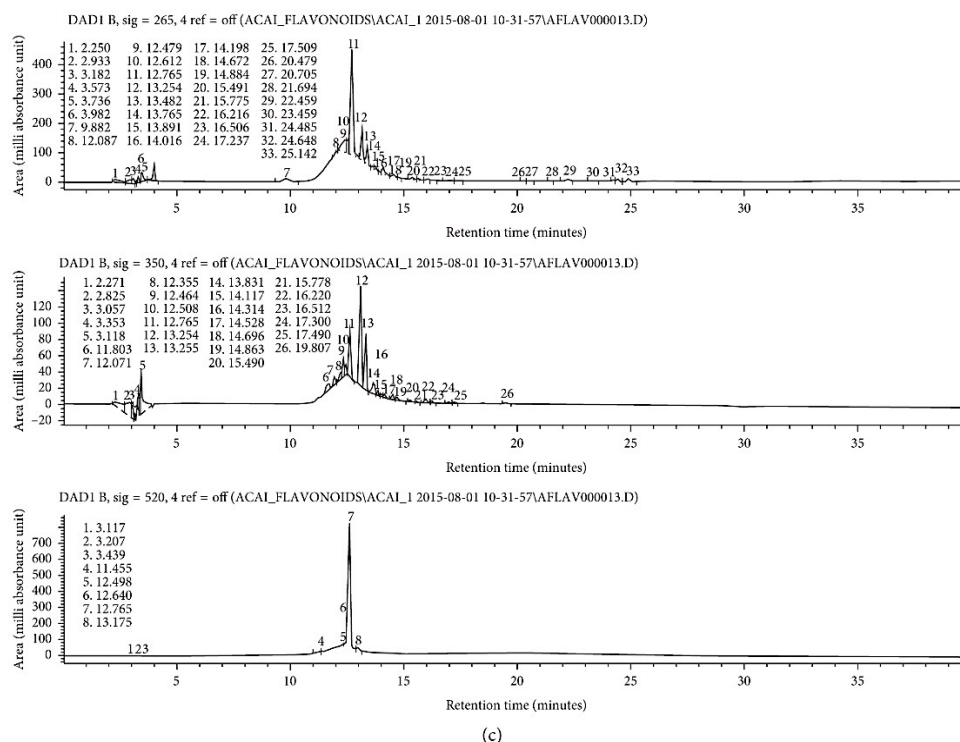


FIGURE 2: (a) A mass spectrometry graph of the 10% concentration of the vital dye extracted from the acai fruit. (b) A mass spectrometry graph of the 25% concentration of the vital dye extracted from the acai fruit. (c) A mass spectrometry graph of the 35% concentration of the vital dye extracted from the acai fruit.

The reagents used water (produced with purified water from a permutation technique), trifluoroacetic acid (Vetec Ventiltechnik GmbH, Speyer-am-Rhein, Germany), DMSO, and acetonitrile HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). This analysis used the gradients listed in Table 2, thus enabling quantification of all anthocyanins in the same chromatogram.

For the anthocyanin quantification using HPLC, it was first necessary to obtain the anthocyanin profiles using mass spectrometry. This information was used to determine the analytical standards of the anthocyanins which were then obtained from ChromaDex Inc. (Irvine, CA).

Five 25-milligram samples of the same major isolated anthocyanin molecules were used as comparative patterns from higher to lower quantities: cyanidin-3-O-glucoside, homoorientin, orientin, taxifolin, and isovitexin. The same amount (2.0 ± 0.20 mg) of the anthocyanin chemical standards was weighed in separate 10 mL volumetric flasks of 10 ml each. Subsequently, 3 mL of DMSO was added to each flask and subjected to high-frequency ultrasound for 5 minutes until the mobile phase. The patterns were mixed and diluted with the mobile phase.

The anthocyanin concentrations were quantified by HPLC using an electrochemical detector. The 350-nanometer wavelength was identified by the detector showing 1.00 mL/min flow by maintaining the column with the aid of a 40°C oven. The five molecules were used in the mobile phase of the solution in 10 ml/vial containing water and

30% DMSO without being retained in the filter. Such data were used to obtain the anthocyanin concentration for each concentration of the dye.

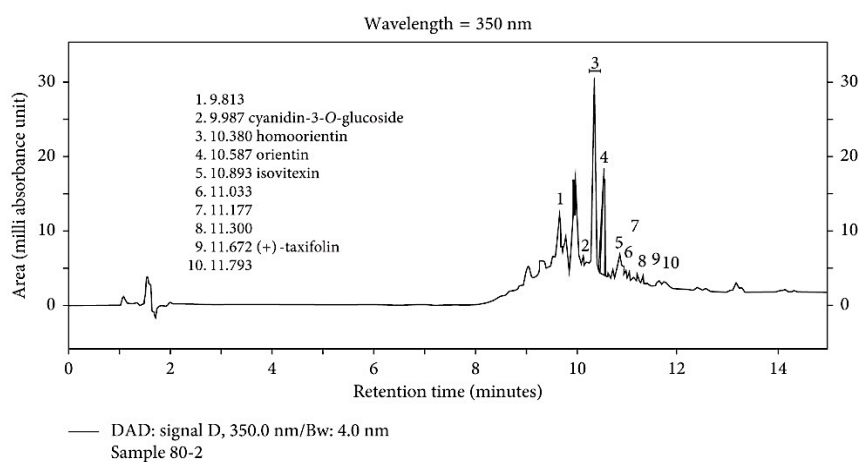
3. Results

3.1. pH and Osmolarity. Correction of pH and osmolarity and the lyophilization process were performed successfully.

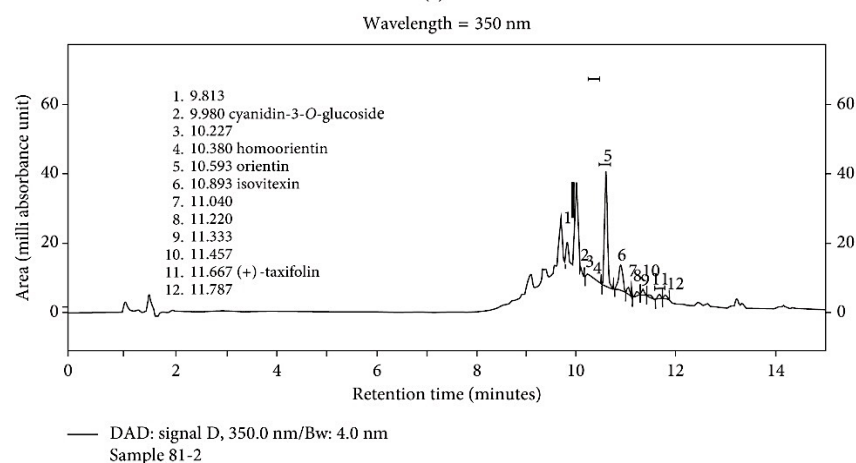
3.2. Mass Spectrometry. This analysis showed the presence of five anthocyanins in the vital dye of the acai fruit from lower to higher quantities: taxifolin, orientin, isovitexin, homoorientin, and cyanidin-3-O-glucoside. Mass spectrometry analysis of the 10%, 25%, and 35% concentrations of the vital dye are shown in Figure 2.

3.3. HPLC. This analysis quantified the five major anthocyanins in the vital dye of the acai fruit in the three tested concentrations based on the retention time by area shown in the chromatographs (Figures 3(a)–3(c)). Results showed that independent of the concentration of the acai dye, the anthocyanin concentration was similar (Table 3).

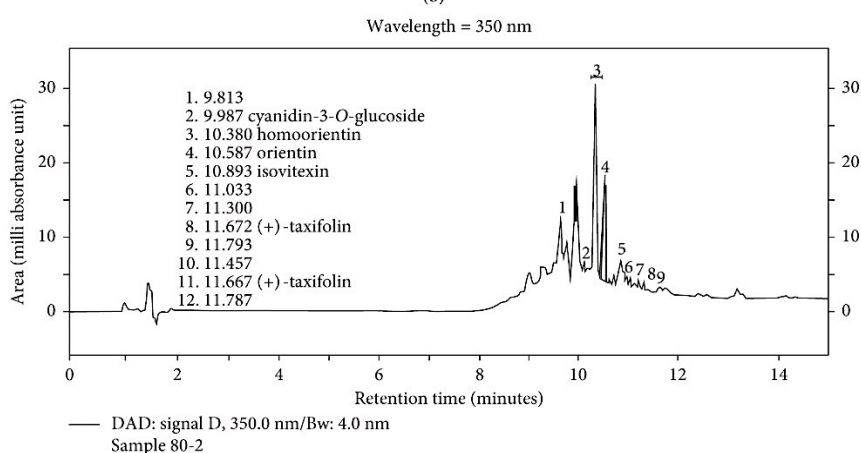
Chromatography results were compared with those of the isolated patterns, which facilitated confirmation of the presence of the anthocyanin molecules through separation of the flavonoids (Figures 4(a)–4(e)).



(a)



(b)

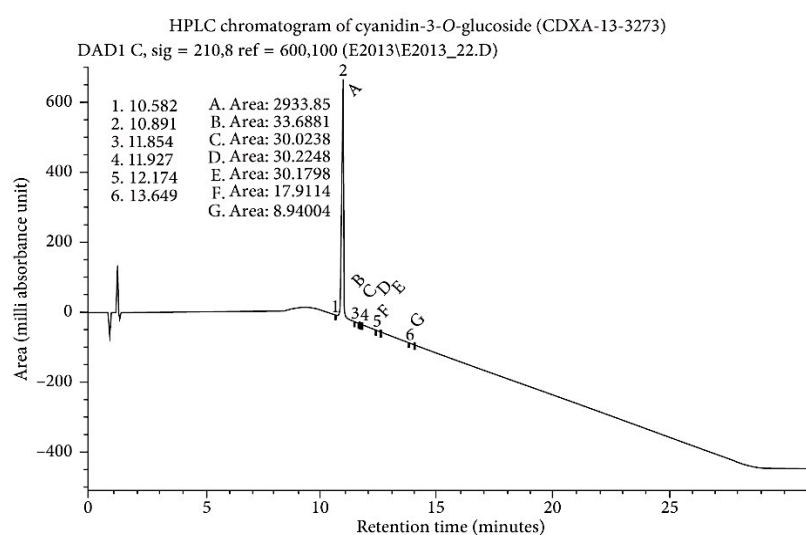


(c)

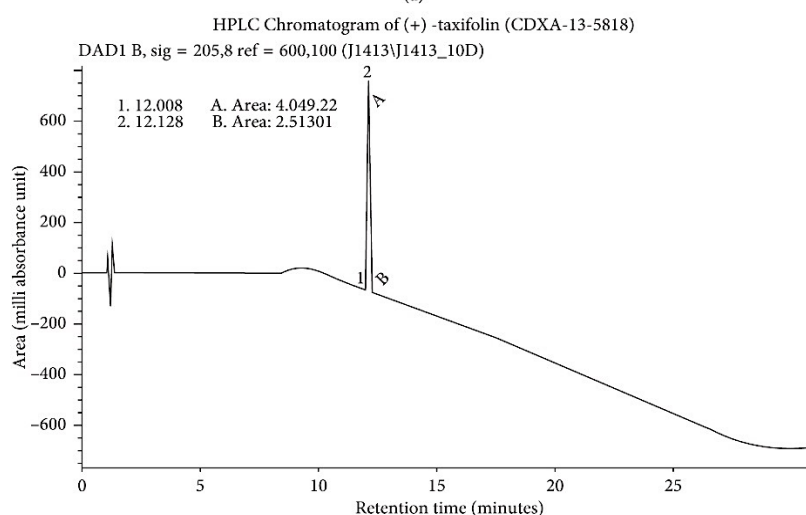
FIGURE 3: (a) A chromatograph of the 80-2 vital dye extracted from the acai fruit in a 10% concentration (equivalent to 100 mg of a lyophilized sample extracted from the acai pulp diluted in 1 ml PBS (pH 7.00; 300 mOsm)). (b) A chromatograph of 81-2 vital dye extracted from the acai fruit in a 25% concentration (equivalent to 250 mg of a lyophilized sample extracted from the acai pulp diluted in 1 ml PBS (pH 7.00; 300 mOsm)). (c) A chromatograph of 82-2 vital dye extracted from the acai fruit in a 35% concentration (equivalent to 350 mg of lyophilized extracted from the acai pulp diluted in 1 ml PBS (pH 7.00; 300 mOsm)).

TABLE 3: Quantification of the anthocyanins based on the retention time by area of HPLC results at the three concentrations.

Anthocyanins	10% concentration	25% concentration	35% concentration
Cyanidin-3-O-glucoside			
Retention time (minutes)	9.987	9.980	9.973
Area (milli absorbance unit)	23.909	24.410	23.886
Homoorientin			
Retention time (minutes)	10.380	10.380	10.380
Area (milli absorbance unit)	38.511	36.950	40.106
Orientin			
Retention time (minutes)	10.587	10.593	10.580
Area (milli absorbance unit)	22.945	22.784	23.988
Taxifolin			
Retention time (minutes)	11.673	11.667	11.667
Area (milli absorbance unit)	0.966	0.894	0.998
Isovitexin			
Retention time	10.893	10.893	10.880
Area (milli absorbance unit)	6.755	6.737	6.194

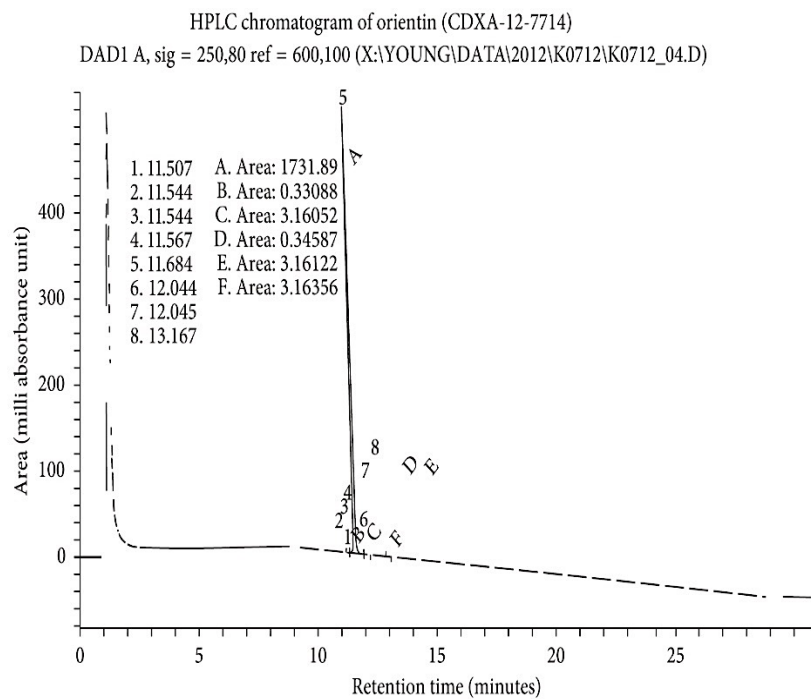


(a)

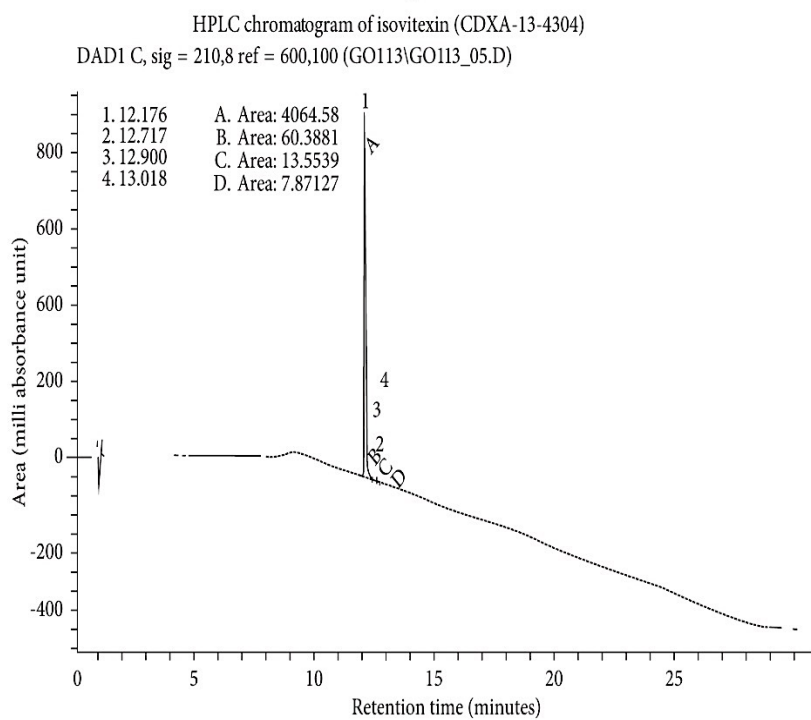


(b)

FIGURE 4: Continued.



(c)



(d)

FIGURE 4: Continued.

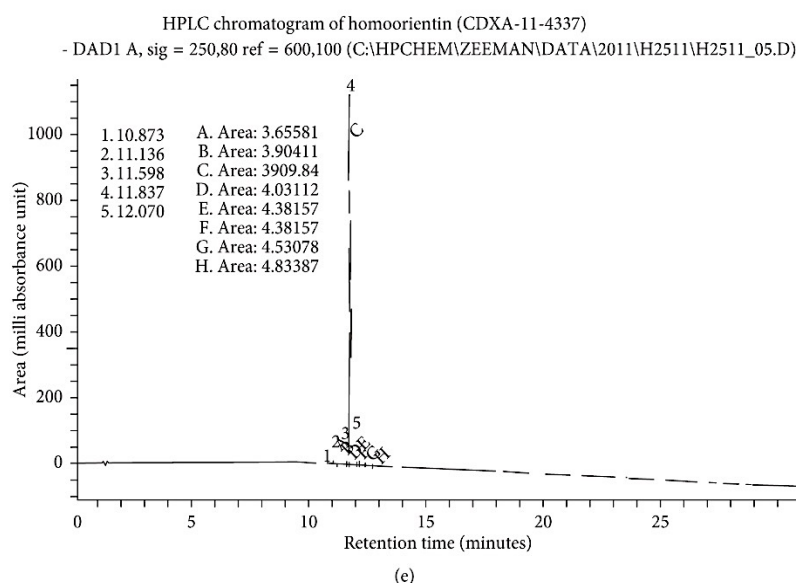


FIGURE 4: (a) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of cyanidin-3-O-glucoside 25 mg. (b) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of taxifolin 25 mg. (c) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of orientin 25 mg. (d) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of isovitexin 25 mg. (e) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of homoorientin 25 mg.

4. Discussion

The acai fruit is a multistemmed palm widely distributed in the northern South America. The fruit varies a great deal in the appearance of the plant, flowers, and fruiting products, which can be affected by genetic and environmental components. Other factors can affect the anthocyanin composition of fruits and their pulp, such as the harvest, type of soil, water quality, and spatial localization [11].

The current study aimed to characterize the physical-chemical composition of the anthocyanins present in the acai extract used in this research. The current data will be used to produce a standardized acai dye for use in chromovitrectomy that was first tested in cadaveric eyes [8] and rabbits [9] and now will be used in a phase I/II clinical trial in humans (unpublished data).

Mass spectrometry and HPLC identified and quantified the presence of five anthocyanins in the vital dye of the acai fruit: cyanidin-3-O-glucoside, homoorientin, orientin, isovitexin, and taxifolin. Data showed that cyanidin-3-O-glucoside is the major anthocyanin. These findings agreed with those of previous studies that also found that cyanidin-3-O-glucoside was the major anthocyanin found in the acai extracts [12, 13]. Results also showed that independent of the concentration of the acai dye, the anthocyanin concentration was similar (Table 3), and this result is probably because we employed the same prime material.

We hypothesized previously [8] that the anthocyanins of the acai fruit might have low potential for causing retinal and RPE toxicity in humans. Spectrophotometry analysis of different dye concentrations from the acai fruit had a peak light absorption around 1,000 nm; it is a fact that the lower

the wavelength of the light source, the higher the energy emission and consequently the more toxic the light source is to the retina [7]. The high absorption peak of light from the acai solution suggests that this dye might have a safer toxicity profile regarding light absorption than other currently available dyes. A study that evaluated the absorbance spectra of nine vital dyes for chromovitrectomy found that most had two absorbance peaks, the first below 400 nm and the other in the visible light ranging from 400 to 700 nm [6].

In conclusion, the pharmacologic correction of the pH to 7.00 and osmolarity to 300 mOsm and the lyophilization process were successfully performed. The five major anthocyanins are present in the vital dye extracted from the acai, the major one being cyanidin-3-O-glucoside. Independent of the concentration of the acai dye, the anthocyanin concentration was similar. These standardized chemical characteristics of this new dye may allow its use during chromovitrectomy in humans. Further basic and clinical studies are needed to fully understand the role of acai dye anthocyanins and their antioxidant capacity.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Disclosure

The authors hold a patent related to the intraocular use of anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*). The patent number (P11333244-8A2) is registered at the National Institute of Intellectual Property, Rio de Janeiro, Brazil.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil; and Pan-American Association of Ophthalmology/Pan-American Ophthalmological Foundation, Paul Kayser Global Award, Arlington, Texas. The authors are grateful to Rubens Belfort Jr., M.D., Ph.D., for donating supplies for the development of this study and to Paulo Schor, M.D., Ph.D., for support regarding application for financial support at Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil.

References

- [1] H. Rogez, *Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação*, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil, 2000.
- [2] S. Darnet, J. L. Serra, A. C. Rodrigues et al., "A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in açaí pulp (*Euterpe oleracea*)," *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 2107–2111, 2011.
- [3] D. Del Pozo-Insfran, C. H. Brenes, and S. T. Talcott, "Phytochemical composition and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 6, pp. 1539–1545, 2004.
- [4] M. S. M. Rufino, J. Pérez-Jiménez, S. Arranz et al., "Açaí (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil," *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 2100–2106, 2011.
- [5] C. S. Peris, E. Badaro, M. A. Ferreira et al., "Color variation assay of the anthocyanins from açaí fruit (*Euterpe oleracea*): a potential new dye for vitreoretinal surgery," *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, vol. 29, no. 8, pp. 746–753, 2013.
- [6] P. Costa Ede, E. B. Rodrigues, M. E. Farah et al., "Vital dyes and light sources for chromovitrectomy: comparative assessment of osmolality, pH, and spectrophotometry," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 50, no. 1, pp. 385–391, 2009.
- [7] Y. Yanagi, Y. Inoue, W. D. Jang, and K. Kadonosono, "A2e mediated phototoxic effects of endoilluminators," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 90, no. 2, pp. 229–232, 2006.
- [8] J. Chen, M. A. Ferreira, M. E. Farah et al., "Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from açaí fruit (*Euterpe oleracea*) and 10 other natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes," *Retina*, vol. 33, no. 11, pp. 89–96, 2013.
- [9] R. R. Caiado, C. S. Peris, A. A. S. Lima-Filho et al., "Retinal toxicity of açaí fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans," *Current Eye Research*, vol. 42, no. 8, pp. 1185–1193, 2017.
- [10] S. Gallori, A. R. Bilia, M. Bergonzi et al., "Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart (Açaí palm)," *Chromatographia*, vol. 59, no. 11–12, pp. 739–743, 2004.
- [11] G. C. Cretu and G. E. Morlock, "Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 146, pp. 104–112, 2014.
- [12] A. V. Carvalho, "Chemical composition and antioxidant capacity of açaí (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 97, no. 5, pp. 1467–1474, 2017.
- [13] K. K. Yamaguchi, L. F. Pereira, C. V. Lamarao, E. S. Lima, and V. F. da Veiga-Junior, "Amazon açaí: chemistry and biological activities: a review," *Food Chemistry*, vol. 179, pp. 137–151, 2015.

3.2 Retinal toxicity of Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans.

Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais E, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SES, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M.

Curr Eye Res. 2017 Aug;42(8):1185-93.



Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe Oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans

Rafael R. Caiado, Cristiane S. Peris, Acácio Alves Souza Lima-Filho, Joao Guilherme Palma Urushima, Eduardo Novais, Emmerson Badaró, André Maia, Rita Sinigaglia-Coimbra, Sung Eun S. Watanabe, Eduardo B. Rodrigues, Michel Eid Farah & Mauricio Maia

To cite this article: Rafael R. Caiado, Cristiane S. Peris, Acácio Alves Souza Lima-Filho, Joao Guilherme Palma Urushima, Eduardo Novais, Emmerson Badaró, André Maia, Rita Sinigaglia-Coimbra, Sung Eun S. Watanabe, Eduardo B. Rodrigues, Michel Eid Farah & Mauricio Maia (2017): Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe Oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans, *Current Eye Research*, DOI: [10.1080/02713683.2017.1297995](https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1297995)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/02713683.2017.1297995>



Published online: 11 May 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=icey20>



Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe Oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans

Rafael R. Caiado^a, Cristiane S. Peris^a, Acácio Alves Souza Lima-Filho^a, Joao Guilherme Palma Urushima^a, Eduardo Novais^a, Emmerson Badaró^a, André Maia^a, Rita Sinigaglia-Coimbra^{a,b}, Sung Eun S. Watanabe^c, Eduardo B. Rodrigues^a, Michel Eid Farah^a, and Mauricio Maia^{a,c}

^aDepartment of Ophthalmology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bElectron Microscopy Center (CEME), Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cBrazilian Institute of Fighting Against Blindness (INBRACE), Assis/Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Purpose: Evaluate toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in a rabbit model.

Methods: Rabbits were injected intravitreally with 10%, 25%, and 35% acai dye concentrations. Control eyes received balanced salt solution (BSS). Electroretinogram (ERG), fundus imaging, fluorescein angiography (FA), optical coherence tomography (OCT), and light and transmission electron microscopy (LM/TEM) were performed.

Results: Fundus imaging showed increased vitreous opacity with increased dye concentrations. FA and OCT showed normality with all concentrations. Comparisons between BSS and dye concentrations were analyzed using Kruskal–Wallis and Mood's median test ($p < 0.05$). At 24 h, ERGs showed reduced amplitudes from baseline in all eyes. Median b-wave amplitudes nonsignificantly decreased and latency increased with 10% and 25%; findings were significant ($p < 0.05$) for 35%. LM and TEM showed no abnormalities for 10% and 25%. With 35%, TEM showed ganglion cell edema at 24 h that resolved after 7 days. Vacuolization, multilamellar bodies, and nerve bundle damage occurred at 24 h/7 days in the inner nuclear layer. Mitochondrial cristae disruption occurred in the inner photoreceptor segment at 24 h that decreased by 7 days.

Conclusion: Ten and twenty-five percent concentrations were safe and may improve identification of the posterior hyaloid and internal limiting membrane during chromovitrectomy in humans.

ARTICLE HISTORY

Received 27 June 2016

Revised 11 January 2017

Accepted 14 February 2017

KEYWORDS

Acai fruit; anthocyanins; chromovitrectomy; *Euterpe oleracea*

Introduction

Vitreoretinal surgery involves complex techniques that may improve diseases such as macular holes, epiretinal membranes (ERMs), and diabetic macular edema.^{1–9} During chromovitrectomy, vital dyes or crystals are used intraoperatively to improve identification of intraocular tissues.^{10,11} Such dyes facilitate visualization and peeling of optically transparent structures, such as internal limiting membrane (ILMs).^{3,6,12–14}

Chromovitrectomy was first introduced in 2000, when the vital dye indocyanine green (ICG) was used to stain the thin, semi-transparent ILM.¹⁴ Since then, many other dyes have become available for chromovitrectomy.¹⁵ Preservative-free and micronized triamcinolone acetate aids identification of the vitreous by crystal deposition and is one of the safest dyes for managing vitreoretinal diseases.^{11,16,17} Trypan blue and patent blue also became alternative vital dyes for use during chromovitrectomy.^{18–21} While triamcinolone acetate is limited to deposition at the posterior hyaloid/vitreous, trypan blue and patent blue stain ERMs but have limited affinity for ILMs.^{19,20}

Although ICG was the first worldwide dye used during chromovitrectomy, ICG is associated with possible retinal

and retinal pigment epithelium (RPE) toxicity.^{5,8} A mechanism of this toxicity may be related to the oxidative effects of the ICG molecule and/or its carbonyl complex derivatives on the RPE cells.^{5,8,22,23} Synthetic brilliant blue G (BBG) has been used as an alternative for staining ILMs and, with the exception of the United States, is currently the most frequently used dye worldwide for this purpose. However, *in vitro* use of BBG may lead to dose-dependent cellular toxicity.²⁴ Unintentional subretinal migration of BBG during vitreoretinal surgery in humans that can damage the RPE also was reported.²⁵

The ideal vital dye should have minimal oxidative effects on tissues; the ability to reliably and selectively stain ILMs, posterior hyaloid, and/or ERMs; and be rapidly eliminated from the eye to avoid possible chronic toxic effects.¹¹ The search for the combination of these characteristics in a theoretically ideal dye has led to further research worldwide. Recently, two cadaveric eye studies have reported that the natural dye extracted from the Brazilian fruit acai (*Euterpe oleracea*) successfully enhanced visualization of the intraocular microstructures during vitreoretinal surgery.^{26,27} Among the advantages of this dye is the high concentration of anthocyanins,^{27,28} which are purple flavonoids in vegetables

CONTACT Mauricio Maia ✉ retina@femaneet.com.br Federal University of São Paulo, 822 Botucatu Street, Vila Clementino, 06023-062, São Paulo, SP, Brazil.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/icey.

The authors hold a patent related to the intraocular use of anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*). The patent number (P11333244-8A2) is registered at the National Institute of Intellectual Property, Rio de Janeiro, Brazil.

© 2017 Taylor & Francis

with potent physiologic antioxidative activity in plants due to molecular stability.²⁹ We hypothesized that this characteristic may result in development of a dye to improve identification of the posterior hyaloid and ILM during vitreoretinal surgery in humans and may quench the singlet oxygen released during light irradiation of the retina by the light probe, resulting in a safer dye useful during chromovitrectomy.^{26,27}

The aim of the current study was to test the toxicity of different dye concentrations extracted from the acai fruit in a rabbit model. This initial research represents the landmark research for testing this alternative vital dye, already tested by our research team, for human use.

Methods

Animals

Eighteen New Zealand albino rabbits (weight, 2–4 kg) were used in this study. The Ethics Committee of the Federal University of São Paulo approved this study (protocol number: 2689281013), which followed the guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology.

All surgical and examination procedures were performed under anesthesia using an intramuscular injection of 25 mg/kg of body weight of ketamine hydrochloride (Ketamina Agener; Agener, Brazil) and 5 mg/kg of body weight of xylazine hydrochloride (Calmiun, Agener, Brazil). Mydriasis was obtained before each procedure by topical application of 0.5% tropicamide (Mydriacyl, Alcon, Brazil) and eyes were topically anesthetized with 0.5% proxymetacaine hydrochloride (Anestalcon, Alcon, USA). Animals were euthanized under deep anesthesia with an intravenous injection of 70 mg/kg sodium pentobarbital.

Animals were excluded if there was a media opacity or retinal damage before the beginning of the study. The animals included in the study were divided randomly into groups according to the concentrations (10%, 25%, and 35%) of the acai (*Euterpe oleracea*) extract dye solution injected.

Dye solution preparation

Ophthalmos Indústria Farmacêutica S/A (São Paulo, Brazil) developed the acai dye. The physical and chemical characteristics of the acai powder extract are shown in Table 1.

Anthocyanins, the basic structure of which is the flavylium cation, are flavonoids that are antioxidants in vegetables. The various anthocyanins differ according to the functional groups (hydrogen, hydroxyls, or methoxyls) positioned in R1–R7.^{30,31} This unstable molecule has a central benzene ring that can quench its singlet oxygen. The mass and anthocyanin composition of the acai powder extract was obtained by request by SGB Consultoria Química LTDA (São Paulo, SP, Brazil). Data showed that the main anthocyanin (antioxidant) found in the acai powder extract was Cyanidin-3-Glucoside.

The lyophilized dye was prepared in a sterile environment (grade A) and diluted in 1 mL of polyvinyl alcohol in three concentrations of the acai fruit extract: 10%, 25%, and 35%. The pH of the natural extract was acidic. Hence, both the pH and osmolarity were controlled and established using a phosphate buffer. These concentrations also reflect the most suitable values obtained in preliminary studies^{12,26,27} that considered factors such as staining capacity, pH, osmolarity, solubility, and stability.

The osmolarity and pH were adjusted to about 300 mOsm and 7.00, respectively, using a diluted dye solution of the anthocyanin in polyvinyl alcohol and phosphate buffer (Ophthalmos, São Paulo, Brazil). The dye solutions were lyophilized, sterilized, and stored in amber flasks based on our previous results that anthocyanin molecules are highly unstable.²⁷

Injection technique

Each rabbit received injections of 0.1 mL of dye solution in the right eye and 0.1 mL of balanced salt solution (BSS) (Alcon, Ft. Worth, TX) in the left eye. After placement of a lid speculum, a drop of topical 5% povidone-iodine was instilled in each eye followed by BSS washout. The vitreous cavity was accessed through the superotemporal sclera 2 mm posterior to the limbus using a 27-ga needle (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) connected to a 1-mL syringe containing the dye solution or BSS. Eyes were immediately examined by indirect ophthalmoscopy; one drop of an antibiotic/steroid (0.5% moxifloxacin/0.1% dexamethasone) solution then was instilled in each eye.

Table 1. Physical and chemical analysis of the acai powder extract.

Analysis	Results
Aspect	Thin hygroscopic powder
Color	Violet
Odor	Characteristic
Humidity (%)	3.6
Volumetric density (g/L)	487.79
Solubility in water	Soluble
Polyphenols	0.53
Heavy metals, As (ppm)	<0.1
Heavy metals, Cd (ppm)	<0.01
Heavy metals, Hg (ppm)	<0.005
Heavy metals, Pb (ppm)	<0.05
Heavy metals, Cu (ppm)	0.3
Acid-insoluble ashes (%)	0.26
Total ashes (%)	0.4
Thin layer chromatography, acai	Positive chromatography profile

Data obtained and used with permission by Anidro do Brasil Extrações S.A., Grupo Centroflora. As, arsenic; Cd, cadmium; Hg, mercury; Pb, lead; Cu, copper.

Toxicity to retinal function

Using the handheld Ephios AB™ system (Ephios, Norrköping, Sweden), electroretinogram (ERG) recordings were taken at baseline, 24 h, and 7 days after the intravitreal injections.

The rabbits were kept in a dark room for 30 min after complete mydriasis was achieved and then placed on a heating pad during the experiment. Unipolar contact lenses ERG-Jet™ electrode (Fabrinal SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) was placed on both corneas with 2% methylcellulose (Ophthalmos, São Paulo, Brazil).

A reference electrode filled with electrolytic gel was placed at the temporal canthus of the eyelid; the ground electrode, also filled with gel, was positioned on the earlobe. After a 30-min period of dark adaptation, the procedure was performed according to two responses, dark-adapted 0.01 ERG (rod response) and dark-adapted 3.0 ERG (combined rod-cone response), following the parameters determined by previous studies.^{12,23,32–34} Light-adapted cone responses were not explicitly recorded.

Ten readings were obtained for each step. The stimulus strength produced by each flash was 0.01 cd s/m² and interval of 2 s between flashes for dark-adapted 0.01 ERG and 3.0 cd s/m² flash with interval of 10 s for dark-adapted 3.0 ERG. The Ganzfeld working distance to the eye was standardized to 1 in.

All examinations were monocular and performed at room temperature. The data were transferred to Mjølner software version 1.3:0.5 and Eph-01 transfer program version 4.0 mc VEP.ADD™ (Ephios, USA). The software determined the values of the amplitude and latency of the b- and a-waves. The baseline recordings were compared to the responses at 24 h and 7 days after injection.

The data are presented as median and standard deviation values. Baseline, 24-h, and 7-day comparisons between BSS and the three dye concentrations were analyzed using Kruskal–Wallis and *post hoc* analysis using Mood's median test. $p < 0.05$ was considered significant. All analyses were done using Stata v.11 software (StataCorp, College Station, USA).

Toxicity to retinal morphology

Fundus imaging and fluorescein angiography (FA) were performed at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injections. Fundus imaging was performed to document the retinal appearance and follow formation of any vitreal opacity. The Topcon TRC camera (Topcon, Tokyo, Japan) was used for this documentation.

FA was performed through a slow intravenous injection of 0.3 mL of 10% sodium fluorescein (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) over 30 s in the marginal ear vein of the animals to avoid iatrogenic blood-barrier breakdown related to a fast injection. Fundus photographs were taken using a Heidelberg Spectralis Device (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) a few seconds after injection and sequentially about every 20 s up to 5 min after the initial intravenous fluorescein injection.

Optical coherence tomography

Optical coherence tomography (OCT) was performed in both eyes of all animals at baseline, 24 h, and 7 days after the intravitreal injection using also Spectralis OCT (Heidelberg, Germany).

Histology

All animals were euthanized 24 h or 1 week after the intravitreal injection. A buffered solution of paraformaldehyde 2% and glutaraldehyde 2.5% (pH 7.4) was injected immediately into the eyes for tissue fixation followed by enucleation. Tissues samples of about 4 mm were collected for processing from two different serial sections: 500 µm inferior to the optic nerve and 4 mm from the optic nerve in the inferotemporal quadrant. This was followed by postfixation with 1% osmium tetroxide, ethanol dehydration, and rinsing in propylene oxide for posterior inclusion in epoxy resin (EPON 814, EMS, Hatfield, PA). Semi-thin serial sections (500 nm) were obtained and stained with 1% toluidine blue for light microscopy (LM) (NIKON Optiphot 2, Tokyo, Japan). Images were captured by a camera connected to a computer (PixeLINK PL-B873CF, Ottawa, Canada).

For transmission electron microscopy (TEM), ultrathin sections (70 nm) were disposed over copper grids and further contrasted with uranyl acetate and lead citrate for examination by electron microscopy at 80 kV (1200 EXII, JEOL, Tokyo, Japan). Electron micrographs were obtained through a digital camera (MultiScan 791, GATAN, Pleasanton, USA).

Digital images obtained for LM or TEM were stored in a Dell workstation computer (Dell Inc., Aliso Viejo, USA) and transformed into TIFF format images with 300-pixel resolution with the aid of Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA). This also was used for levels/contrast/brightness adjustments and figure composition.

Results

Clinical observations

No abnormal or unusual findings were observed in any animal in the anterior and posterior segments.

ERG

No significant differences ($P > 0.05$) were seen in the median amplitude values in microvolts of dark-adapted 0.01 ERG, dark-adapted 3.0 ERG a-wave, and dark-adapted 3.0 ERG b-wave between groups at baseline and 7 days after injection (Tables 2 and 3).

The median amplitude values obtained at 24 h (Table 4) for dark-adapted 0.01 ERG ($P = 0.008$) and dark-adapted 3.0 ERG b-wave ($P = 0.007$) for tested groups differed significantly. Overall, the amplitude values decreased from baseline to 24 h and after 7 days for all concentrations with a trend toward complete recovery.

The latency median values in milliseconds (dark-adapted 0.01 ERG implicit time, dark-adapted 3.0 ERG a-wave implicit

Table 2. Descriptive and comparative analysis (Kruskal–Wallis) of full field electroretinography (ERG) at baseline.

Dark-adapted 0.01 ERG	BSS	10%	25%	35%	<i>p</i> (<0.05)
b-wave					
Amplitude (μV)	135 (47–180)	114 (100–125)	121 (60–178)	137 (100–160)	0.309
Implicit time (ms)	55 (50–75)	61 (55–165)	60 (50–65)	60 (50–75)	0.228
a-wave					
Amplitude (μV)	10 (6–40)	10 (7–16)	9 (5–12)	12 (10–13)	0.191
Implicit time (ms)	25 (13–25)	25 (20–25)	25 (20–25)	24 (13–25)	0.546
b-wave					
Amplitude (μV)	216 (110–260)	210 (190–230)	175 (105–270)	183 (170–212)	0.185
Implicit time (ms)	45 (40–60)	45 (40–50)	50 (40–50)	47 (40–50)	0.954

The median values (minimum and maximum) of measurements prior to injection are presented.

Table 3. Descriptive and comparative analysis (Kruskal–Wallis) of full field electroretinography (ERG) after 7 days.

Dark-adapted 0.01 ERG	BSS	10%	25%	35%	<i>p</i> (<0.05)
b-wave					
Amplitude (μV)	165 (87–210)	150 (120–220)	173 (65–280)	110 (58–250)	0.879
Implicit time (ms)	60 (50–60)	60 (20–70)	65 (60–70)	65 (60–80)	0.083
a-wave					
Amplitude (μV)	8 (2–12)	8 (8–20)	5 (5–5)	10 (9–10)	0.204
Implicit time (ms)	25 (12–25)	25 (25–25)	25 (25–25)	25 (25–25)	0.801
b-wave					
Amplitude (μV)	175 (144–265)	225 (170–280)	227 (190–265)	155 (138–180)	0.135
Implicit time (ms)	50 (20–50)	45 (45–50)	43 (40–45)	50 (34–53)	0.659

The median values (minimum and maximum) of measurements 7 days after injection are presented.

Table 4. Descriptive and comparative analysis (Kruskal–Wallis) of full field electroretinography (ERG) after 24 h.

Dark-adapted 0.01 ERG	BSS	10%	25%	35%	<i>p</i> (<0.05)
b-wave					
Amplitude (μV)	165 (100–220)	100 (100–130)	70 (60–105)	54 (46–75)	0.008*
Implicit time (ms)	70 (60–75)	70 (65–85)	70 (60–75)	75 (65–75)	0.663
a-wave					
Amplitude (μV)	10 (8–15)	10 (8–12)	4 (4–5)	15 (4–27)	0.093
Implicit time (ms)	25 (13–25)	25 (25–25)	25 (20–25)	25 (25–25)	0.338
b-wave					
Amplitude (μV)	200 (120–275)	160 (150–165)	90 (85–120)	73 (49–80)	0.007*
Implicit time (ms)	50 (45–55)	40 (35–55)	55 (40–60)	44 (42–50)	0.378

The median values (minimum and maximum) of measurements 24 h after injection are presented.

Asterisks indicate the significance level of Kruskal–Wallis test comparing BSS and the different dye concentrations tested.

time, and dark-adapted 3.0 ERG b-wave implicit time) did not differ significantly ($P > 0.05$) among groups at any of the tested time intervals (Tables 2–4). Overall, the latency values did not decrease markedly in individual cases.

thickness and preserved internal architecture, and normal pigment epithelium complexes and reflectivity for both eyes. Images obtained at 24 h showed vitreous opacity that was not observed after 7 days for all concentrations.

Fundus imaging, FA, OCT

Figures 1–3, respectively, show the results of fundus imaging, FA, and OCT at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection of the 10%, 25%, and 35% concentrations.

Fundus imaging showed that independent of the concentration tested, the vitreous opacity decreased over time. FA showed similar behavior among the concentrations. Independent of the dye concentration used, at 24 h, all FA images had dense opacity that prevented image acquisition. After 7 days, the opacity decreased markedly and images for all three concentrations were obtained. This examination did not show a reduction from the normal expected fluorescence. OCT images for all three concentrations showed retinal surfaces with normal contours, neurosensory retinas with normal

Retinal morphology by histology using LM and TEM

LM histologic examination of eyes injected with the 10% and 25% concentrations showed no major anatomic signs of toxicity and had a similar histologic appearance to that of the controls without signs of altered retinal anatomy or inflammation at 24 h and 7 days (Figure 4). Animals that received the 35% concentration had what appeared to be ganglion cells edema at 24 h (Figure 4G) and discrete rarefaction of the outer nuclear layer at 7 days (Figure 4H).

Ultrastructural analysis showed that the 10% and 25% concentrations did not disrupt the appearance of the retinal layers similar to control eyes (Figure 5A, D, G, and J). The 35% concentration caused mild swelling of the ganglion cells and mitochondria with cristae disarrangement that were

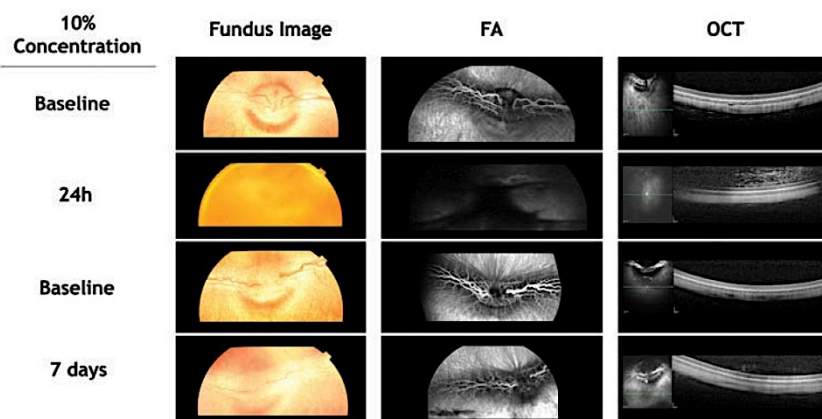


Figure 1. Fundus imaging, fluorescein angiography (FA), and optical coherence tomography (OCT) at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection in the group receiving the 10% dye concentration. The images show normal tissue. 24 h, 24 hours.

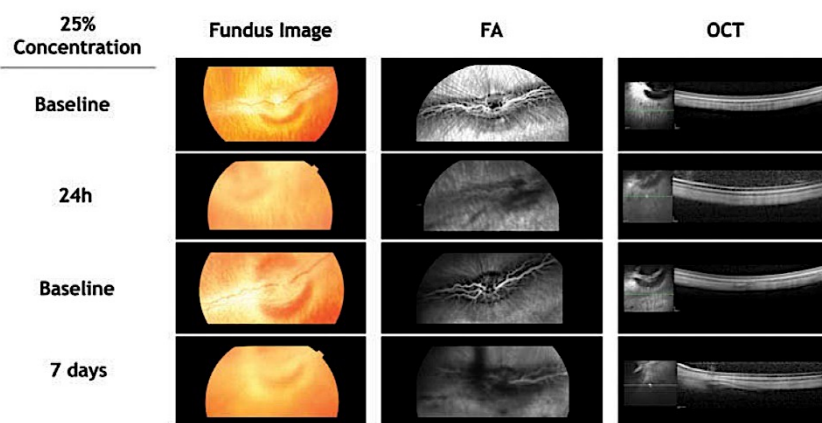


Figure 2. Fundus imaging, fluorescein angiography (FA), and optical coherence tomography (OCT) at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection in the group receiving the 25% dye concentration. The images show normal tissue. 24 h, 24 hours.

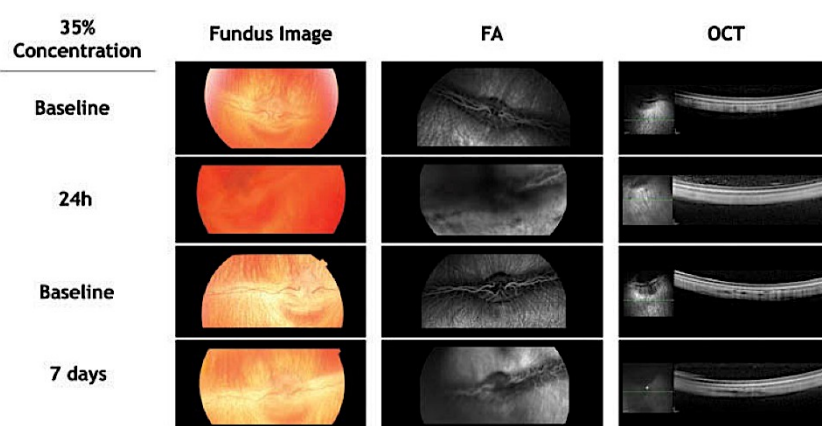


Figure 3. Fundus imaging, fluorescein angiography (FA), and optical coherence tomography (OCT) at baseline 24 h and 7 days after intravitreal injection in injection in the group receiving the 35% dye concentration. The images show normal tissue. 24 h, 24 hours.

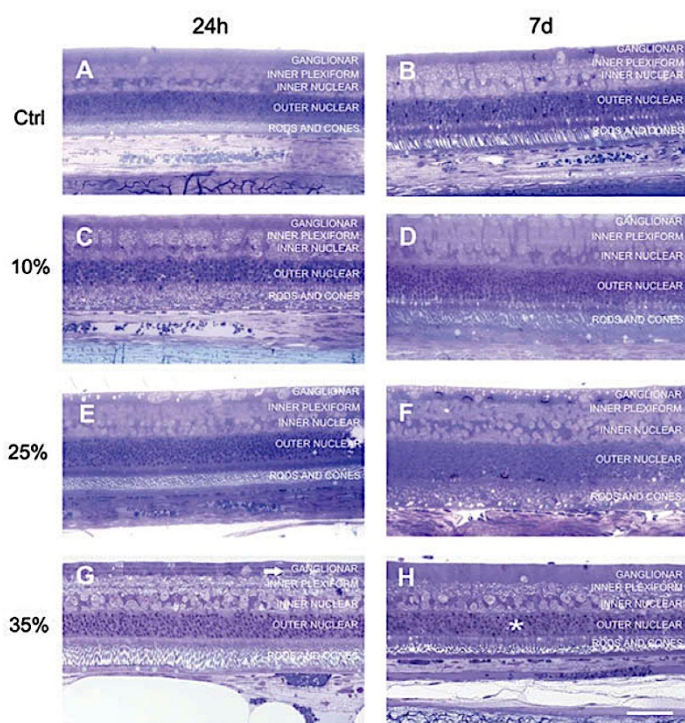


Figure 4. Representative micrographs of rabbit retina survival at 24 h and 7 days after intravitreal injection with the 10%, 25%, and 35% dye concentrations and controls. The control retinas after intravitreal injection with BSS at 24 h and 7 days, respectively (A, B). No major retinal abnormalities are seen in eyes injected with the 10% and 25% concentrations at 24 h or 7 days (C–F). The 35% concentration at 24 h and 7 days causes swelling of the ganglion cells (G-arrow) and discrete rarefaction of the outer nuclear layer (H-asterisk). The apparent difference in thickness of the layers seen on light microscopy is related to preparation artifacts of semi-thin cross-sections by the action of chloroform on epoxy resin cuts. Semi-thin 500-nm cross-sections are stained with 1% toluidine blue (magnification bars, 100 μ m). 24 h, 24 hours; 7 d, 7 days; ctrl, control.

observed after 24 h (Figure 5B) but in lesser extent at 7 days (Figure 5C). At 7 days, the ganglion cells also had cytoplasmic vacuolization and numerous multilamellar bodies (Figure 5C). Prominent vacuolization, the abundant multilamellar bodies, and damaged nerve bundles also were seen at 24 h and 7 days in the inner nuclear layer (Figure 5E and F). No abnormalities were seen in the outer nuclear layer (Figure 5H and I). Numerous mitochondria with cristae disarrangement were seen in the inner segment of the photoreceptors at 24 h (Figure 5K) but to a lesser extent at 7 days (Figure 5L). The outer segment of the photoreceptors was preserved at both time points (Figure 5K and L).

Discussion

Anthocyanins are flavonoids, a secondary class of plant metabolites that contain a general structure of two phenyl rings and one heterocyclic ring. Flavonoids are potent antioxidants^{30,31} that reduce protein oxidation and increase expression of the enzyme paraoxanase 2 in macrophages.^{35,36} Evaluation of the anthocyanin content of the acai powder extract by SGB Consultoria Química LTDA showed that its main constituent is cyanidin-3-glucoside (10%: 0.152 mg; 25%: 0.379 mg; 35%: 0.516 mg), which agreed with a previous study that showed

that the phytochemical composition of the acai pulp is rich in cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside.²⁸ According to high-performance liquid chromatography analysis, the antioxidant content present for each acai dye concentration was 0.0099% for 10%, 0.0247% for 25%, and 0.0346% for 35%.

Trolox equivalent antioxidant capacity is a measurement of the antioxidant strength based on the molecule Trolox (an analog of vitamin E). Due to the difficulties in measuring individual components of complex mixtures (such as in the acai fruit), a Trolox equivalency is used as a benchmark for the antioxidant capacity of such a mixture.³⁷ The total antioxidant capacity of the acai pulp was reported to be 48.6 μ mol Trolox equivalents/mL.³⁸ This value was superior to other fruit rich in anthocyanins such as strawberries (18.3–22.9), raspberries (19.2–22.6), and grape juice (18.2–26.7). This study also showed that the antioxidant activity against the superoxide anion, the peroxy radical of the acai fruit, is greater than any other previously described in the literature.³⁸

The antioxidant capacity of the acai dye also means that it can quench the singlet oxygen that is released after dye irradiation by light during vitreoretinal surgery.^{39,40} This important characteristic, associated with the fact that the stain extracted from the acai fruit has a strong purple color with

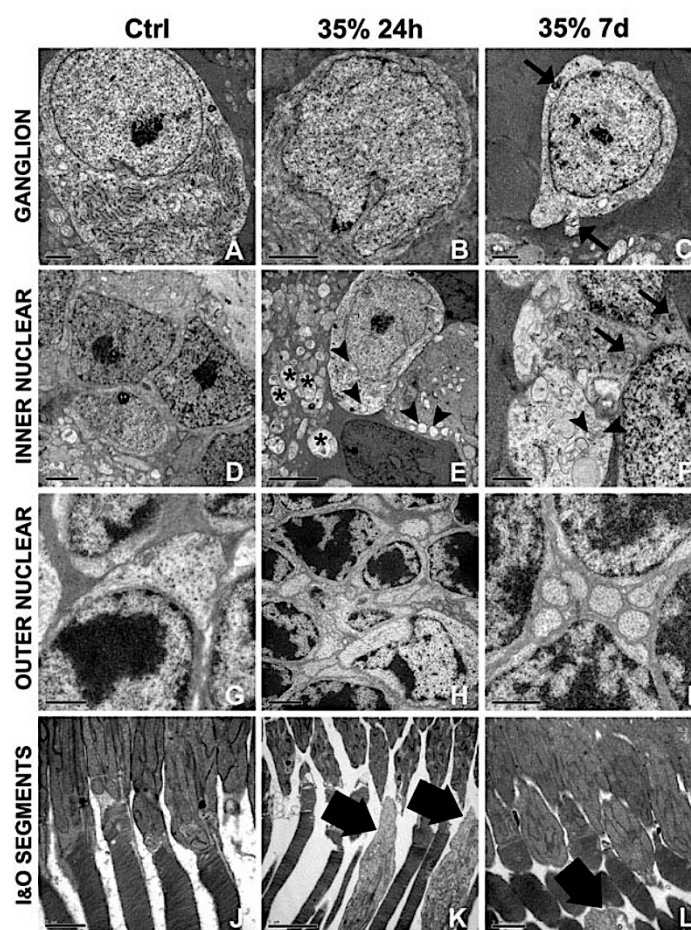


Figure 5. Representative electron micrographs of rabbit retinas 24 h and 7 days after intravitreal injection with the 35% dye concentration and controls. The different retina layers are shown in control images (A—ganglion layer; D—inner nuclear layer; G—outer nuclear layer; and J—inner and outer segments). Twenty-four hours after intravitreal injection, discrete ganglion cell swelling and mitochondrial damage were seen (B). The presence of multilamellar bodies became more prominent at 7 days (C—arrows). The inner nuclear layer presented nerve bundle damage (E—asterisks), disrupted mitochondrion (E and F—arrow heads), and abundant multilamellar bodies (F—arrows). No abnormalities were seen in the external nuclear layer (H, I). The inner and outer photoreceptors segments did not have major abnormalities, but mitochondria cristae disarrangement in the inner segment at 24 h (K—large arrows) was seen but in a lesser extent at 7 days (L—large arrows). 24 h, 24 hours; 7 d, 7 days; ctrl, control.

affinity for the ILM of cadaveric eyes, supports the premise that the dye may be useful for use during vitreoretinal surgery in humans.²⁷ Further, our previous study found a high affinity of acai fruit anthocyanins for human ILMs.²⁷

To the best of our knowledge, the current study is the first to report the toxicity profiles of three concentrations of a dye extracted from the acai fruit in rabbits. The intraocular use of this dye during vitreoretinal surgery in humans is protected by a patent in Brazil (no. P11333244-8A2).

The pH and osmolarity were controlled and established to be 7 and 300, respectively, because this is recognized to be physiologic for human eyes.²⁷ Polyvinyl alcohol was used as the dye solvent because it is nontoxic, compatible with most ophthalmologic medications and preservatives and can be sterilized readily by autoclaving or filtering.⁴¹

To evaluate the functional and morphologic toxicity of the acai dye, we used procedures frequently employed in other

toxicologic evaluations. The functional evaluation was performed using ERG. The morphologic examinations included fundus imaging, FA, OCT, and LM and TEM histology.

Interpretation of the ERG results showed that the dark-adapted 0.01 ERG and dark-adapted 3.0 ERG b-wave amplitudes at 24 h using the 35% concentration had a significantly ($p < 0.05$) lower value in microvolts compared to BSS (Table 4).

TEM showed abnormalities associated with the 35% concentration in the inner and outer retinal cells at the same timeline (Figure 5K and L), revealing a toxicity profile. These preliminary data suggested that the 35% concentration of the acai fruit extract should be avoided during chromovitrectomy in human eyes. However, data showed that the 10% and 25% concentrations caused no functional or morphologic abnormalities, indicating that those concentrations can be used during chromovitrectomy in humans.

Fundus imaging showed that vitreous opacity decreased over time independent of the concentration (Figures 1–3). This suggested that the acai dye is efficiently eliminated from the ocular tissues.

FA results did not show a reduction from the normal expected fluorescence for any of the dye concentrations, and no vascular abnormalities were observed.

LM and TEM histologic evaluations of the 10% and 25% concentrations showed slight retinal alterations similar to those associated with the BSS injections. This may be due to the injection itself or be a physiologic variability.²²

OCT was negative for retinal edema or atrophy with the three concentrations. It is important that the results for eyes injected with the acai dyes were similar to the contralateral eyes for all testing, except that the 35% concentration caused cellular edema in the ganglion cells and outer photoreceptor segments. The ganglion cells swelled at 24 h (Figure 5B) and pronounced vacuolization, abundant multilamellar bodies, and nerve bundle damage in the internal nuclear layer were seen at both time points (Figure 5E and F). Morphology results, matched by the ERG findings, suggested that acai is safe in rabbit eyes at concentrations of 10% and 25%; however, the 35% concentration may be associated with functional and morphologic abnormalities detected by TEM (Figure 5).

The current results are important since a clinical trial testing the use of the acai dye is ongoing at the Federal University of São Paulo. Based on the current findings, the dye extracted from the acai fruit at concentrations of 10% and 25% was used in a clinical trial in human eyes. Similar preclinical investigations of the retinal biocompatibility of six novel vital dyes for chromovitrectomy showed that new dyes had dose-dependent toxicity in rabbits.¹² Future studies may include functional and morphologic tests to compare acai dye with other dyes used frequently during chromovitrectomy surgery.

The current study has limitations that must be considered. The analysis was performed in rabbit eyes and the results may not be completely applicable to humans. The vitreous cavities of rabbits have a smaller volume and retinas are thinner compared to humans. This could have enhanced the toxicity results for the tested dye.

However, toxicity results could have been reduced because the dye was injected in a non-vitrectomized rabbit eye. When the surgery is performed in a vitrectomized cavity, the dye will be left in direct contact with the retina. Therefore, probably a higher concentration will be effectively in contact with the retina during vitrectomy in human eyes compared to that seen in non-vitrectomized rabbit eyes.

Still, during chromovitrectomy in humans, the dye is aspirated from the vitreous cavity at the end of the surgery, which was not performed in the current study. This means that the dye was left in the vitreous cavity of rabbits for a longer time than would occur in humans.

Despite these limitations, the current study will serve as the basis for the potential use of the dye extracted from acai fruit during chromovitrectomy in humans. Its capacity to stain ILMs purple using the 10% and 25% concentrations is being tested in humans in an ongoing study.

It is unlikely that the 35% concentration of acai dye blocked the entrance of light inside the eye and resulted in

the decreased b-wave amplitude due to decreased retinal neuron stimulation, because the latency also was delayed compared to the 10% and 25% concentrations. The cellular edema that developed with the 35% concentration provides further scientific evidence that chemical toxicity was the main cause of the alterations seen on ERG.

In conclusion, the 10% and 25% dye concentrations from the acai fruit did not cause significant functional or morphologic toxicity. However, the 35% concentration showed evidence of morphologic and functional abnormalities suggestive of temporary toxic effects at 24 h follow-up. The dye extracted from the acai fruit in concentrations of 10% and 25% was safe in a rabbit model and may be safe and useful for improving identification of the posterior hyaloid and ILM during chromovitrectomy in humans.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Funding

Publication of this article was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; São Paulo, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brasília, Brazil), and Pan-American Association of Ophthalmology/Pan-American Ophthalmological Foundation, Paul Kayser Global Award (PAAO/PAOF; Arlington, Texas).

References

1. Kurihara K, Ishibashi T, Oshima K. The residual epiretinal membrane after vitrectomy for macular hole. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237(8):648–653.
2. Lam DS, Chan WM, Tam BS. Macular hole surgery using thrombin-activated fibrinogen and selective removal of the internal limiting membrane. *Retina* 1999;19(5):478–479.
3. Kadosono K, Itoh N, Uchio E, Nakamura S, Ohno S. Staining of internal limiting membrane in macular hole surgery. *Arch Ophthalmol* 2000;118(8):1116–1118.
4. Mester V, Kuhn F. Internal limiting membrane removal in the management of full-thickness macular holes. *Am J Ophthalmol* 2000;129(6):769–777.
5. Gandorfer A, Haritoglou C, Gass CA, Ulbig MW, Kampik A. Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage. *Am J Ophthalmol* 2001;132(3):431–433.
6. Kadosono K, Yazama F, Itoh N, Uchio E, Nakamura S, Akura J, et al. Treatment of retinal detachment resulting from myopic macular hole with internal limiting membrane removal. *Am J Ophthalmol* 2001;131(2):203–207.
7. Kusaka S, Hayashi N, Ohji M, Hayashi A, Kamei M, Tano Y. Indocyanine green facilitates removal of epiretinal and internal limiting membranes in myopic eyes with retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2001;131(3):388–390.
8. Engelbrecht NE, Freeman J, Sternberg P Jr., Aaberg TM Sr., Aaberg TM Jr., Martin DF, et al. Retinal pigment epithelial changes after macular hole surgery with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 2002;133(1):89–94.
9. Caiado RR, Magalhaes O Jr., Badaro E, Maia A, Novais EA, Stefanini FR, et al. Effect of lens status in the surgical success of 23-gauge primary vitrectomy for the management of rhegmatogenous retinal detachment: the Pan American Collaborative Retina Study (PACORES) group results. *Retina* 2015;35(2):326–333.

10. Rodrigues EB, Meyer CH, Kroll P. Chromovitrectomy: a new field in vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243(4):291–293.
11. Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol* 2009;148(3):332–340.
12. Rodrigues EB, Penha FM, Farah ME, de Paula Fiod Costa E, Maia M, Dib E, et al. Preclinical investigation of the retinal biocompatibility of six novel vital dyes for chromovitrectomy. *Retina* 2009;29(4):497–510.
13. Rodrigues EB, Meyer CH, Farah ME, Kroll P. Intravitreal staining of the internal limiting membrane using indocyanine green in the treatment of macular holes. *Ophthalmologica* 2005;219(5):251–362.
14. Burk SE, Da Mata AP, Snyder ME, Rosa RH Jr., Foster RE. Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane. *Ophthalmology* 2000;107(11):2010–2014.
15. Hiebl W, Gunther B, Meinert H. [Substances for staining biological tissues: use of dyes in ophthalmology]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2005;222(4):309–311. German.
16. Peyman GA, Cheema R, Conway MD, Fang T. Triamcinolone acetate as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloid during pars plana vitrectomy. *Retina* 2000;20(5):554–555.
17. Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottos J, Dib E, et al. The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv Ophthalmol* 2009;54(5):576–617.
18. Perrier M, Sebag M. Epiretinal membrane surgery assisted by trypan blue. *Am J Ophthalmol* 2003;135(6):909–911.
19. Mennel S, Meyer CH, Tietjen A, Rodrigues EB, Schmidt JC. Patent blue: a novel vital dye in vitreoretinal surgery. *Ophthalmologica* 2006;220(3):190–193.
20. Kumar A, Prakash G. Differential staining with indocyanine green and trypan blue dye. *Indian J Ophthalmol* 2004;52(4):339.
21. Feron EJ, Veckeneer M, Parys-Van Ginderdeuren R, Van Lommel A, Melles GR, Stalmans P. Trypan blue staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 2002;120(2):141–144.
22. Maia M, Kellner L, de Juan E Jr., Smith R, Farah ME, Margalit E, et al. Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into the subretinal space in rabbits. *Retina* 2004;24(1):80–91.
23. Maia M, Margalit E, Lakhnani R, Tso MO, Grebe R, Torres G, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina* 2004;24(1):69–79.
24. Yuen D, Gonder J, Proulx A, Liu H, Hutnik C. Comparison of the in vitro safety of intraocular dyes using two retinal cell lines: a focus on brilliant blue G and indocyanine green. *Am J Ophthalmol* 2009;147(2):251–259 e2.
25. Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB. Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling. *Br J Ophthalmol* 2009;93(12):1687.
26. Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves Ferreira RE, de Moraes Filho MN, et al. Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*) and 10 other natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes. *Retina* 2013;33(1):89–96.
27. Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira EL, Maia A, et al. Color variation assay of the anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*): a potential new dye for vitreoretinal surgery. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013;29(8):746–753.
28. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem* 2006;54(22):8604–8610.
29. Qin C, Li Y, Zhang R, Niu W, Ding Y. Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mockstrawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Nat Prod Res* 2009;23(17):1589–1598.
30. Kahkonen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 2003;51(3):628–633.
31. Rahman MM, Ichinaga T, Komiyama T, Hatano Y, Konishi T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic Res* 2006;40(9):993–1002.
32. Badaro E, Souza-Lima RA, Novais EA, Maia M, Hirai F, Meyer CH, et al. Investigation of new dyes for chromovitrectomy: pre-clinical biocompatibility of trisodium, orangell and methyl violet. *Int J Retina Vitreous* 2015;1:1.
33. Cardoso EB, Moraes-Filho M, Rodrigues EB, Maia M, Penha FM, Novais EA, et al. Investigation of the retinal biocompatibility of acid violet for chromovitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251(4):1115–1121.
34. de Oliveira Dias JR, Badaro E, Novais EA, Colicchio D, Chiarantini GM, Matioli MM, et al. Preclinical investigations of intravitreal ziv-aflibercept. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2014;45(6):577–584.
35. Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta (1–42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2009;20(4):269–275.
36. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated by unesterified cholesterol through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Biol Chem* 2007;388(12):1353–1358.
37. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26(9–10):1231–1237.
38. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem* 2004;52(6):1539–1545.
39. De Rosso VV, Moran Vieyra FE, Mercadante AZ, Borsarelli CD. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radic Res* 2008;42(10):885–891.
40. Jang YP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JR. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 2005;81(3):529–536.
41. Havener WH. *Ocular Pharmacology*, 6th ed. St. Louis, MO: CV Mosby Company; 1994, p. 630.

3.3 A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results.

Caiado RR, Peris C, Rodrigues EB, Farah ME, Maia A, Magalhães O Jr, Novais E, Lima-Filho AS, Maia M.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019 Jan 3. doi: 10.1007/s00417-018-04204-y. [Epub ahead of print].

RETINAL DISORDERS



A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results

Rafael R. Caiado¹ · Cristiane Peris¹ · Eduardo B. Rodrigues¹ · Michel Eid Farah¹ · André Maia¹ · Octaviano Magalhães Jr¹ · Eduardo Novais¹ · Acácio Souza Lima-Filho^{1,2} · Mauricio Maia^{1,3}

Received: 25 September 2018 / Revised: 20 November 2018 / Accepted: 27 November 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose To test the applicability of the acai dye at a 25% concentration for identifying the posterior hyaloids and internal limiting membranes (ILMs) during pars plana vitrectomy (PPV) in human eyes with macular holes (MHs).

Methods This study included 25 patients with chronic idiopathic MHs. The exclusion criteria included glaucoma, previous significant ocular conditions, and previous ocular surgeries except uncomplicated cataract. Ten surgeons performed 23-gauge four-port PPV, phacoemulsification, posterior hyaloid detachment, ILM peeling guided by dye staining, and perfluoropropane injection. The patients remained prone for 5 days postoperatively. The patients were evaluated postoperatively after 1, 30, and 180 days. The surgeons completed a questionnaire regarding the dye's staining abilities.

Results The posterior hyaloids and ILMs stained purple in all eyes. The final best-corrected visual acuity improved significantly ($p < 0.001$) from preoperatively (1.37 ± 0.29) to 180 days postoperatively (1.05 ± 0.43). The MHs closed in 76% of eyes.

Conclusion The acai dye at a 25% concentration identified posterior hyaloids and ILMs during PPVs in humans. Dye toxicity was unlikely.

Keywords Acai dye · Internal limiting membrane · Pars plana vitrectomy · Posterior hyaloid · Toxicity

Introduction

The application of vital dyes during vitreoretinal surgery to facilitate identification of preretinal tissues and membranes, i.e., chromovitrectomy, was introduced in 2000 by applying the vital dye indocyanine green (ICG) to stain the thin, semi-transparent internal limiting membrane (ILM) [1].

ICG is associated with retinal and retinal pigment epithelium (RPE) toxicity [2, 3], and the mechanism of which might

be related to the oxidative effects of the ICG molecule, specifically the iodine and/or its carbolinic complex derivative effects over the RPE cells [2–5]. Synthetic brilliant blue G (BBG) has been used as an alternative for staining ILMs and, except in the USA, is currently the most frequently used dye worldwide for this purpose; however, in vitro use of BBG can cause dose-dependent cellular toxicity [6]. Unintentional subretinal migration of BBG during vitreoretinal surgery in humans also may damage the RPE [7]. Until recently (PUBMED search, July 25, 2018), no single dye stains both the posterior hyaloid and ILM.

The ideal vital dye for chromovitrectomy should cause minimal oxidative effects on retinal tissues and selectively and reliably stain both the ILMs and posterior hyaloids; the dye also should be eliminated rapidly from the eye to avoid possible chronic toxicity [8]. In addition, potential development of dyes cheaper than those currently available is important for modern vitreoretinal surgery [7–9].

In 2013, we performed two studies using cadaveric eyes that found that the natural dye extracted from the Brazilian fruit acai (*Euterpe oleracea*) successfully enhanced identification of the intraocular microstructures during vitreoretinal

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00417-018-04204-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mauricio Maia
maiamauricio@terra.com.br

¹ Vision Institute, Department of Ophthalmology, Federal University of São Paulo, 781, Pedro de Toledo Street, 2nd floor, São Paulo 04039-032, Brazil

² Ophthalmos Pharmaceutical Industry, São Paulo, Brazil

³ Brazilian Institute of Fight Against Blindness, Assis/Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

surgery [9, 10]. The potential advantage of the dye was the high concentration of anthocyanins, the basic structure of which is the flavylium cation, a flavonoid that has an antioxidant effect in plants [11–13]. The main anthocyanin found in the acai powder is cyanidin-3-glucoside [13–16]. Previous studies have shown that anthocyanins from the acai fruit inhibit generation of reactive oxygen species and the activity of cyclooxygenases 1 and 2 [17]. The antioxidant capacity of the acai dye also might result in the ability of the molecule to quench the singlet oxygen released after dye irradiation by light during vitreoretinal surgery [13, 18].

We observed recently that the 10% and 25% concentrations of the acai dye were safe when used in a rabbit model [14], in which rabbits were injected intravitreally using 10%, 25%, and 35% concentrations of the acai dye. Functional and morphologic examinations were performed. The 35% concentration caused temporary toxic effects seen at the 24-h evaluation. The 10% and 25% dye concentrations did not cause significant functional or morphologic toxicity. Since the highest concentration of the acai fruit that was safe and effective in the rabbit model was 25%, we selected this concentration for the current clinical trial in humans with macular holes (MHs) [14].

The aim of the current clinical trial was to test the efficacy and safety of the acai dye at the 25% concentration for identifying posterior hyaloids and ILMs during vitreoretinal surgery in humans.

Patients and methods

Study design

This prospective, interventional, non-randomized clinical study was registered at clinicaltrials.gov (NCT02691429). The consort flow diagram and checklist are available (Supplemental Digital Content 1). The Ethics Committee of the Federal University of São Paulo (Institutional Review Board number 466.833) and the National Brazilian Council of Research (CONEP authorization number 1.139.211) approved the study, which was conducted according to the Research Guidelines of the Association of Research in Vision Ophthalmology and the Declaration of Helsinki. To avoid BIAS during data interpretation, 10 surgeons performed 25 procedures following an aleatory protocol defined by the Ethics Committee of the Federal University of São Paulo. All patients provided informed consent regarding the benefits and risks of the surgical procedure and the new dye tested.

Dye solution preparation

Ophthalmos Pharmaceutical Industry S/A (São Paulo, Brazil) developed the acai dye. Our research team previously

corrected other chemical properties of the dye (pH, osmolality, solubility, and stability) [9, 10] so that the extracted acai powder had chemical properties biocompatible with the ocular physiologic environment (pH, 7; osmolality, 300 mOsm). Density also was established to be 1.1 mg/cm³ to facilitate delivery to the target structures during chromovitrectomy. The higher density of the acai dye compared to balanced salt solution (BSS) facilitated dye deposition over the posterior hyaloids and ILMs [7, 9, 10].

Because the purple color of the anthocyanin molecule is unstable over time [10], a lyophilization process was necessary. Therefore, the acai dye preparation was divided in two moments: the lyophilization process that occurred in the laboratory and the dilution process that occurred just before surgery. Lyophilization was prepared in a sterile environment (grade A), and the acai powder was stored in amber flasks. Dilution was performed using 1 mL of balanced saline solution that was injected inside the amber flask. To standardize the procedure, surgeons were instructed to dilute the acai powder 10 min before surgical use.

Patients

Twenty-five eyes (25 patients) with idiopathic MHs who were indicated for vitreoretinal surgery followed by posterior hyaloid and ILM removal were included.

Phacoemulsification was performed in all phakic eyes to avoid possible postoperative cataract induction that could result in bias related to possible decreases in the best-corrected visual acuity (BCVA).

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were men and women diagnosed with any size idiopathic MHs who were older than 18 years and not pregnant. All patients signed a consent form. Patients were excluded who had undergone a previous vitreoretinal surgery and had active uveitis, glaucoma, diabetic retinopathy, retinal detachment, age-related macular degeneration, retinal vascular occlusion, or any other ocular conditions that could affect or limit the postoperative results.

Preoperative physical and ocular evaluations

Patients were followed over 180 days postoperatively. The preoperative data obtained for each patient included the medical history, age, gender, and ocular history, including the time from symptom onset until surgery. All patients underwent a preoperative physical evaluation that included systemic blood pressure and heart rate measurements and classification of the systemic risk associated with the surgical procedures. Patients did not stop taking any anticoagulant medications.

A baseline ophthalmologic examination that was based on the Snellen BCVA measurement was performed. The BCVAs were converted to the logarithm of the minimal angle of resolution (logMAR) for statistical analysis and comparisons. Intraocular pressure (IOP) was measured using Goldmann applanation tonometry. Slit-lamp biomicroscopy of the anterior and posterior segments was performed followed by a dilated fundus examination. The intraocular lens (IOL) power calculations were performed using noncontact partial coherence laser interferometry (IOLMaster, version 3.01).

Toxicity to retinal morphology and function

Fundus imaging, fluorescein angiography (FA), and fundus autofluorescence (AF) were performed at baseline and 30 and 180 days postoperatively using a TRC-501A camera (Topcon).

All MHs were classified based on spectral-domain OCT images (Spectralis, Heidelberg Engineering). For each patient, the attached/detached posterior hyaloid, retinal layer architecture, central macular thickness, and integrity of the inner segment/outer segment junction were assessed.

The spectral-domain RTVue-XR Avanti system (software version, 2014.2.0.93, Optovue) was used to acquire optical coherence tomography angiography (OCTA) and en-face images in all eyes. Three-dimensional OCT angiograms were obtained over a 3×3 -mm square. The OCT images facilitated detailed evaluation of the tissue morphology; OCTA showed the vascular impairment due to the disease [19].

The toxicity to retinal function was analyzed using full-field and multifocal electroretinography (ffERG/mfERG) recordings. The ERG procedures followed the rules of the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision protocol [20, 21] for both procedures. For ffERG, the pupils were dilated with tropicamide 1% and phenylephrine 10% drops, and the subjects were dark-adapted for 30 min at the site before recording. Tetracaine (1.0%) drops were instilled to anesthetize the corneal surface. Under red illumination, a Burian-Allen bipolar contact lens electrode (Hensen Ophthalmic Laboratories) was placed on the corneal surface. A drop of 2% methylcellulose was placed on the inside surface of the contact lens for protection and to ensure good electrical contact. A gold cup was applied to the earlobe and served as a ground electrode. Visual response imaging system software was used with the FMSIII stimulator running at 75 Hz. The peak-to-peak amplitudes (microvolts) and the implicit times (milliseconds) were determined at each step of the standard protocol.

The mfERGs were recorded monocularly after full pupillary dilation and at least 10 min of light adaptation in ambient room light. A fundus camera was used to monitor fixation. The same type of bipolar contact lens electrode used to record

the ffERGs was used for the mfERG recordings. Visual stimuli for the mfERGs consisted of 103 black and white hexagons alternating in a semi-random sequence, modulated according to a binary m-sequence. This hexagonal array subtended 20° of the visual field. The peak of the first-order kernel (P1) was used to measure the implicit time, and the difference between the first trough and P1 response served as the amplitude of each waveform. The average responses of the amplitudes and implicit times were obtained in six concentric annular retinal regions (rings) centered on the fovea and considered for statistical analysis.

Surgical procedures

Ten experienced surgeons performed the standardized surgical procedures and completed a questionnaire postoperatively.

Phakic patients underwent standard combined phacoemulsification and IOL implantation. All surgeries were performed using the Constellation Vitrectomy System (Alcon Laboratories) and a four-port pars plana vitrectomy (PPV) using a 23-gauge vitrectomy system and valved trocars; a fourth sclerotomy was created using the 25-gauge Tornambe Torpedo (Insight Instruments Inc.) for extra diffuse illumination. A Binocular Indirect Ophthalmomicroscope (Oculus BIOM System) was used for noncontact, wide-angle surgery.

The OPMI Lumera 700 microscope integrated with a Rescan 700 spectral-domain OCT (Carl Zeiss Meditec) facilitated obtaining videos, snapshots, and intraoperative OCT (iOCT) images to document all surgical steps (Figs. 1 and 2).

The acai dye was diluted 10 min before the beginning of the procedure. The dye was first injected to stain the vitreous/posterior hyaloid. It was also injected a second time to stain the ILM. Intraoperatively, core vitrectomy was performed at a rate of 5000 cuts/min, with a maximal level of 400-mmHg aspiration for about 5 min. When the posterior hyaloid was attached to the posterior pole, the hyaloid was detached using a vitreous probe (aspiration rate 400 mmHg) and the cut mode turned off (Fig. 1). In all cases, identification of the posterior hyaloid was aided by injection of 0.3 ml of dye using a 23-gauge soft-tip cannula (Synergetics). The dye (0.3 ml) was delivered gently over the posterior pole. Figures 1 and 2 show that when the acai dye was delivered, it was heavier than BSS (density, 1.1 mg/cm^3) and deposited over the posterior pole with no flushing required. The dye was left for 5 min before removal. The fact that the dye was left for 5 min was based on previous study protocols in cadaveric eyes performed by our research team [9, 10]. Peeling was performed using a 23-gauge ILM forceps (Figs. 1 and 2). After peeling was completed (Figs. 1 and 2), a fluid-air exchange was performed to remove all BSS before the fluid-air exchange to perfluoropropane 15% gas tamponade.

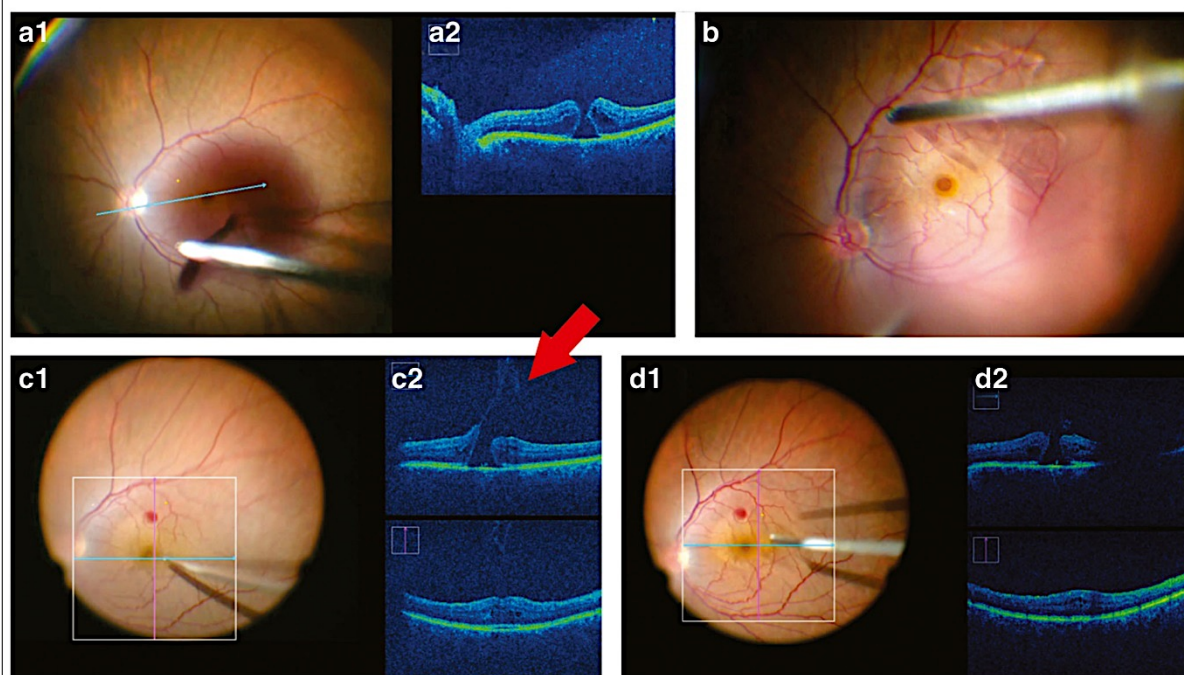


Fig. 1 Snapshots and iOCT images show chromovitrectomy using the 25% acai dye. **A1** The image shows that with gentle delivery of the acai dye, it is heavier than BSS and tends to deposit over the posterior pole. **A2** The iOCT image obtained simultaneously with that in A1 shows a MH. **B** Visualization of the posterior hyaloid detachment using the 25% acai dye.

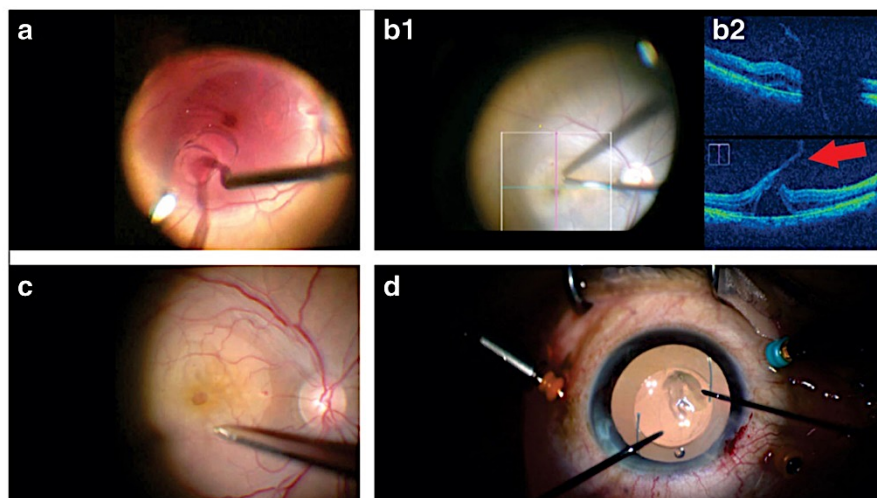
C1 The image shows the start of ILM peeling. **C2** An iOCT image obtained simultaneously with that in C1 shows ILM removal (arrow). **D1** Completion of ILM peeling. **D2** The iOCT image obtained simultaneously with that in D1 shows the MH after the procedure

At the end of surgery, all trocars were removed and no sutures were placed. A subconjunctival injection of 0.2 mL of gentamicin and dexamethasone solution was administered before the lid speculum was removed. The patients were instructed to maintain a facedown position for 5 days postoperatively. The video (Supplemental Digital Content 2) can be accessed on-line.

Questionnaire

The 10 surgeons completed a questionnaire immediately after each procedure to assess the ability of the new dye to stain the intraocular structures based on a scale of 0 to 10 (Supplemental Material 3), with 0 indicating the worst and 10 indicating the best performance comparable to the “golden standard” dyes currently

Fig. 2 Snapshots and iOCT images show chromovitrectomy using the 25% acai dye. **A** Another example shows gentle delivery of the acai dye and its deposition over the posterior pole. **B1** The image shows ILM peeling. **B2** An iOCT image obtained simultaneously with that in B1 shows ILM removal (arrow). **C** The image shows completion of ILM peeling and the differences in the colors between the peeled and unpeeled areas. **D** The image shows the stained ILM above the cornea at the end of surgery



available in the market, triamcinolone acetonide (TA) for vitreous/posterior hyaloid deposition and BBG for the ILM staining.

The questions were based on two published studies [22, 23] validated previously by our research team and approved by the ethics committee of the Federal University of São Paulo.

Follow-up

Patients underwent postoperative ophthalmologic examinations on postoperative days 1, 7, 30, and 180 that included BCVA and IOP measurement, slit-lamp evaluation, and funduscopy.

Fundus imaging, FA, OCT, and OCTA of the macular area were performed to identify possible toxicity related to retinal morphology on days 30 and 180 postoperatively. The fERG and mfERG evaluations were more accurate assessments of the retinal function on the same timeline.

Statistical analysis

Initially, the data were analyzed by descriptive evaluation. Absolute and relative frequencies were presented for the categorical variables, and summaries of the measurements (mean, median, minimal, maximal, and standard deviation [SD]) were used for numerical variables. The Student's *t* test compared the means between the two similar evaluation periods. Analysis of variance with repeated measures was used to compare the means between more than two periods of evaluation.

The non-parametric Friedman test was used to compare the means of the surgeons' gradings of the dye regarding the acai dye deposition at the vitreous core and posterior hyaloid, ILM visibility after re-staining, and dye usefulness due to the non-normality of the distribution of the scores. When differences in the means occurred, they were analyzed using the multiple comparisons Dunn-Bonferroni test to maintain a reliable level of global significance.

For ERG results, categorical variables were presented as absolute and relative frequencies and for numerical variables as the average and SD. The average a-wave amplitude and implicit time, b-wave amplitude and implicit time, and the ratio between the b-wave and a-wave amplitudes and rings between the two time points were compared using the Student's *t* test for paired samples.

For the statistical tests, the significance level was 5%. Analyses were performed using the SPSS 20.0 (IBM-SPSS Inc.) and STATA 12 statistical software (Stata Corp).

Results

Demography and preoperative clinical profile

In the current study, 25 patients (25 eyes) (mean age \pm SD, 68.56 ± 7.56 years) with idiopathic MHs had a

mean baseline logMAR BCVA of 1.37 ± 0.29 . The mean IOP was 14.92 ± 2.93 mmHg. Twenty-one eyes were phakic (84%). The average disease duration was 23.72 ± 17.7 months; 16% of MHs were stage 2, 24% stage 3, and 60% stage 4.

Surgical anatomic outcomes and clinical observations

All patients were followed for 6 months. The MHs closed postoperatively in 19 (76%) eyes, and all eyes were pseudophakic because the phakic eyes underwent phacoemulsification and PPV. The IOP did not change significantly ($p = 0.957$).

During the first postoperative week, cells were present in the anterior chamber and fibrin on the IOL in three eyes; symptoms resolved in all cases after 1 week using topical corticosteroid eye drops. One patient had high IOP (maximal value 24 mmHg) that resolved spontaneously after treatment with eye drops; one patient had a rhegmatogenous retinal detachment at 30 days.

Despite that only 76% of the MHs closed, after 30 days, OCT showed reduction of the base diameter (preoperative 1227.96 ± 413.55 ; postoperative 180 days, 312.75 ± 596.84 ; $p < 0.001$), minimal diameter (preoperative 590.46 ± 266.73 ; postoperative 180 days, 147.58 ± 270.27 ; $p < 0.001$), and height (preoperative 447.25 ± 69.14 ; postoperative 180 days, 116.29 ± 213.89 ; $p < 0.001$).

Surgeons observed that the acai dye was unable to stain the epiretinal membrane (ERM). Since the ERMs were thin, discrete, and not predominant around the hole, our research team used the same surgical technique to remove the ERMs "en block" within the ILM peeling procedure. The presence of ERM did not interfere with the ILM staining. Therefore, surgeons always initiated the ILM peeling in areas where the ERM was not present.

No dye-related abnormalities were seen at 30 and 180 days postoperatively according to AF, FA, OCT, and OCTA images (Figs. 3 and 4).

Surgical outcomes and functional evaluation

The final logMAR BCVA improved significantly ($p < 0.001$) from preoperatively (1.37 ± 0.29) to 180 days postoperatively (1.05 ± 0.43). However, it did not improve significantly ($p > 0.05$) between 30 and 180 days postoperatively.

The fERGs showed more markedly increased implicit times of the scotopic (dark-adapted, 0.01 cycle/degree [cd]/ s/m^2 and 3.0 $\text{cd}/\text{s}/\text{m}^2$) and photopic responses (light-adapted 3.0 cd/m^2) at 30 days and slight recovery at 180 days. The rod amplitudes (dark adapted 0.01 $\text{cd}/\text{s}/\text{m}^2$) also decreased mildly with recovery at 180 days (Table 1). mfERGs showed a significantly ($p = 0.014$) increased amplitude in ring 1 at 30 and 180 days

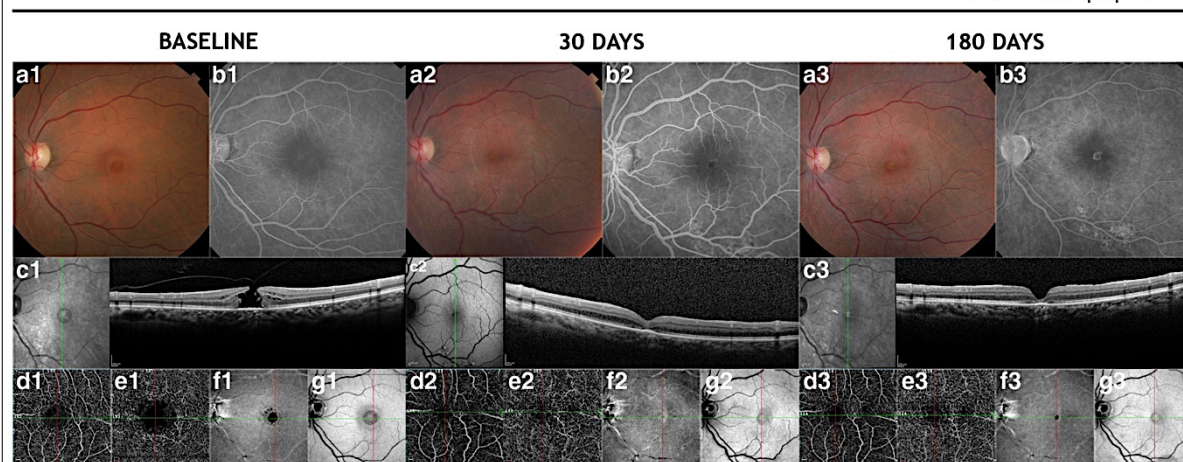


Fig. 3 Baseline and postoperative images (30 and 180 days) of the same patient obtained using fundus imaging, DA, OCT, and OCTA. **A1** A baseline fundus image shows a full-thickness MH. **A2, A3** Fundus images obtained 30 and 180 days postoperatively show MH closure, respectively. **B1** A baseline angiogram shows a central window defect at the macular area. **B2, B3** Angiograms 30 and 180 days postoperatively central and inferior to the macula window defects, respectively. **C1** A baseline OCT image shows a full-thickness MH. **C2** An OCT image obtained 30 days postoperatively shows MH closure; however, the ellipsoidal zone and external limiting membrane are disrupted. **C3** An OCT image obtained 180 days postoperatively shows MH closure with decreased retinal thickness. **D1** A baseline OCTA superficial plexus image of the retinal vasculature with a MH shows a slightly enlarged foveal avascular zone.

D2, D3 Images 30 and 180 days postoperatively, respectively, show a decreased foveal avascular zone. **E1** A baseline OCTA deep plexus image of the retinal vasculature shows significant perifoveal vascular dropout. **E2, E3** Images obtained 30 and 180 days, respectively, show the decreased foveal avascular zone with reperfusion of the perifoveal vasculature. **F1, G1** Baseline OCTA structural en-face images segmented at the inner plexiform layer (IPL) and RPE, respectively, show hyporefective spaces around the circular hyporefective center of the MH. **F2, F3, G2, G3** Postoperative structural en-face OCT images 30 and 180 days postoperatively show regression of the hyporefective areas. **F3** A small circular hyporefective area on the IPL segmentation reappears with central foveal retina atrophy

compared with baseline. The implicit time changes were observed in all rings of the central retina except ring 1. Overall, the implicit time delays were marked at 30 days and recovered slightly at the final evaluation despite the delayed mfERG responses (Table 2).

Intraoperative dye findings

Three intraoperative dye characteristics were observed: The solution was deposited on the posterior pole due to its higher density than BSS, and therefore, no flushing was needed; the dye stained the ILM, core vitreous, and posterior hyaloid purple; and the dye was removed easily from the posterior pole.

Questionnaire

All surgeons reported that the dye identified both the posterior hyaloids and ILMs. (Appendix). After dye injection, only the ILM, core vitreous, and posterior hyaloid were stained; other structures were not. At the end of surgery, the dye was seen on the ILM after 19 (76%) procedures. Overall, the surgeons' satisfaction rates for the dye capability to be deposited at the vitreous were 24 (96%) and for ILM staining 22 (88%) (Appendix).

When the acai dye was compared to surgeons' previous experience using TA, scores for dye deposition at the vitreous core and posterior hyaloid reached means of 7.0 ± 1.0 and 8.8 ± 1.4 , respectively. Surgeons' previous experience using BBG compared to the acai dye for ILM visibility after dye injection was a mean of 7.1 ± 1.5 . The surgeons classified dye vitreous deposition with a significantly ($p < 0.001$) higher score compared to other variables.

The graph (Supplemental Digital Content 3) shows the homogeneity of the values of the evaluated variables. Not all aspects of the dye were similar ($p < 0.001$). Dye deposition at the posterior hyaloid compared with the ILM received a superior evaluation; however, all surgeons considered this innovative dye useful for vitreous and ILM identification.

Discussion

Staining ability is the most important determinant of intraoperative use of vital dyes [24, 25]. Currently, the most common procedures use TA to identify the posterior hyaloid/vitreous base and BBG/ICG to identify the ILM [26]. Previous studies have reported that the dye from the acai fruit selectively stains structures purple in cadaveric and rabbit eyes [9, 10, 14]. The current results showed that the purple stain simultaneously

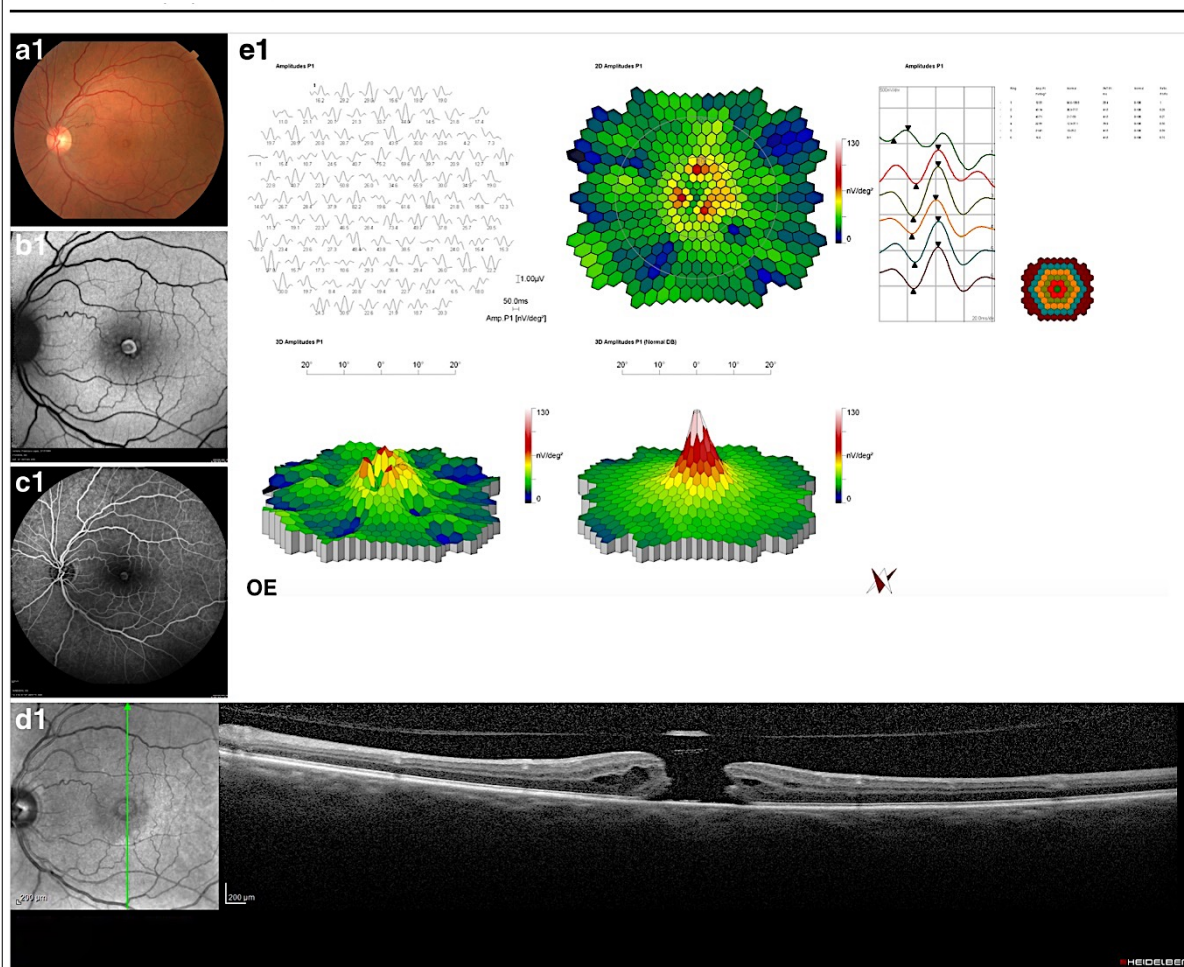


Fig. 4 Baseline and postoperative images (30 and 180 days) of the same patient obtained using fundus imaging, AF, FA, OCT, and mfERG. **A1** A baseline fundus image shows a full-thickness MH. **A2, A3** Fundus images obtained 30 and 180 days postoperatively show MH closure, respectively. **B1** Baseline fundus AF shows hyper-AF in the macula. **B2, B3** Fundus AF images 30 and 180 days postoperatively show no hypo-AF. **C1** A baseline angiogram shows a central window defect at the macular area. **C2, C3** Angiograms obtained 30 and 180 days postoperatively show discrete macular window defects. **D1** A baseline OCT image shows a full-

thickness MH. **D2** An OCT image obtained 30 days postoperatively shows MH closure, whereas the ellipsoidal zone and external limiting membrane remain defective. **D3** An OCT image obtained 180 days postoperatively shows MH closure with decreased retinal thickness. **E1** A baseline image shows mfERG dimensional response density plot and trace array. The image suggests an amplitude response reduction. **E2, E3** The images show mfERG dimensional response density plots and trace arrays 30 and 180 days, respectively, with amplitude improvement

and selectively stained the vitreous core and posterior hyaloid (Fig. 1) and ILM (Fig. 2) in human eyes. This unique property is an advantage since only one dye can achieve what currently requires two different dyes for distinct chromovitrectomy steps [1, 8, 24, 26–28]. In addition, anthocyanins from the acai dye are thought to be responsible for this staining ability, and their distributions are in the following descending order: cyanidin-3-O-glucoside, homoorientin, orientin, isovitexin, and taxifolin [16].

To analyze the safety profile of the acai dye, we performed anatomic and functional evaluations. The mean duration of the MHs in this study was 23.72 ± 17.7 months and the mean size $1227 \pm 413 \mu\text{m}$. Because of the MH chronicity and size, a poor surgical prognosis was expected (independent of any dye) using this surgical technique of ILM peeling. In fact, this closure rate was similar to other studies that evaluated the postoperative chronic MHs [29, 30]. Significant ($p < 0.001$) reductions in the MH base diameter, minimal diameter, and

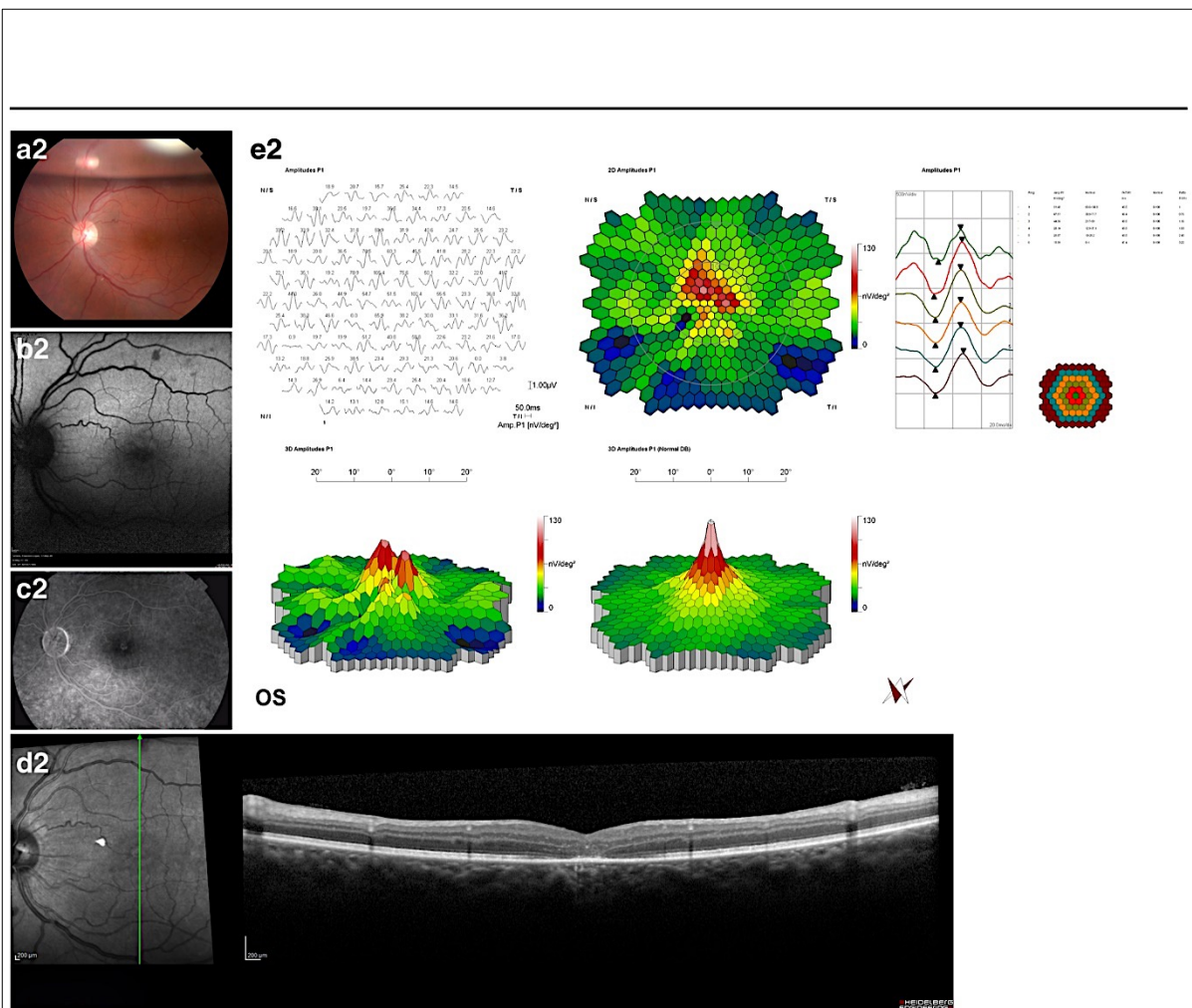


Fig. 4 (continued)

height also were seen after 30 days on OCT images, indicating anatomic improvement. Other findings obtained by AF, FA, OCT, and OCTA did not show abnormalities suggestive of dye toxicity up to 180 days postoperatively. Finally, the logMAR BCVA improved significantly ($p < 0.001$) from pre-operatively (1.37 ± 0.29) to 180 days postoperatively (1.05 ± 0.43).

The reversed ILM flap may be an interesting surgical technique when managing large macular holes. However, our research team has decided to use the “traditional method” (which is the ILM removal) which is currently still the most frequent technique used worldwide and also in our service. Additionally, this is the technique that contains the largest number of manuscripts published, and all surgeons were comfortable with the procedure.

Fibrin developed on the IOL in three of 25 eyes, all of which were treated with combined phaco-PPV, and the fibrin regressed 1 week postoperatively using topical steroids.

Similar findings have been reported after cataract surgeries [31, 32].

The eye that developed retinal detachment had no postoperative inflammation. The tear was at the 6 o'clock position that is associated with undefined intraoperative tears induced by posterior vitreous detachment. In this case, the surgical complication was treated successfully by surgical reintervention and the BCVA improved compared to baseline.

The current functional findings were obtained by measuring the BCVAs and ERGs. While the mean BCVA improved significantly ($p < 0.001$) at 180 days postoperative, ERG is a more objective and sensitive method to evaluate functional results. mfERGs showed that the average values for ring 1 and implicit time P1 analysis improved progressively from baseline to 180 days, which likely resulted from foveal anatomic improvement at macular closure [29–31]. The changes in rings 2 to 6 and the implicit time P1 at 30 days did not change significantly from 30 to 180 days. Since this is an

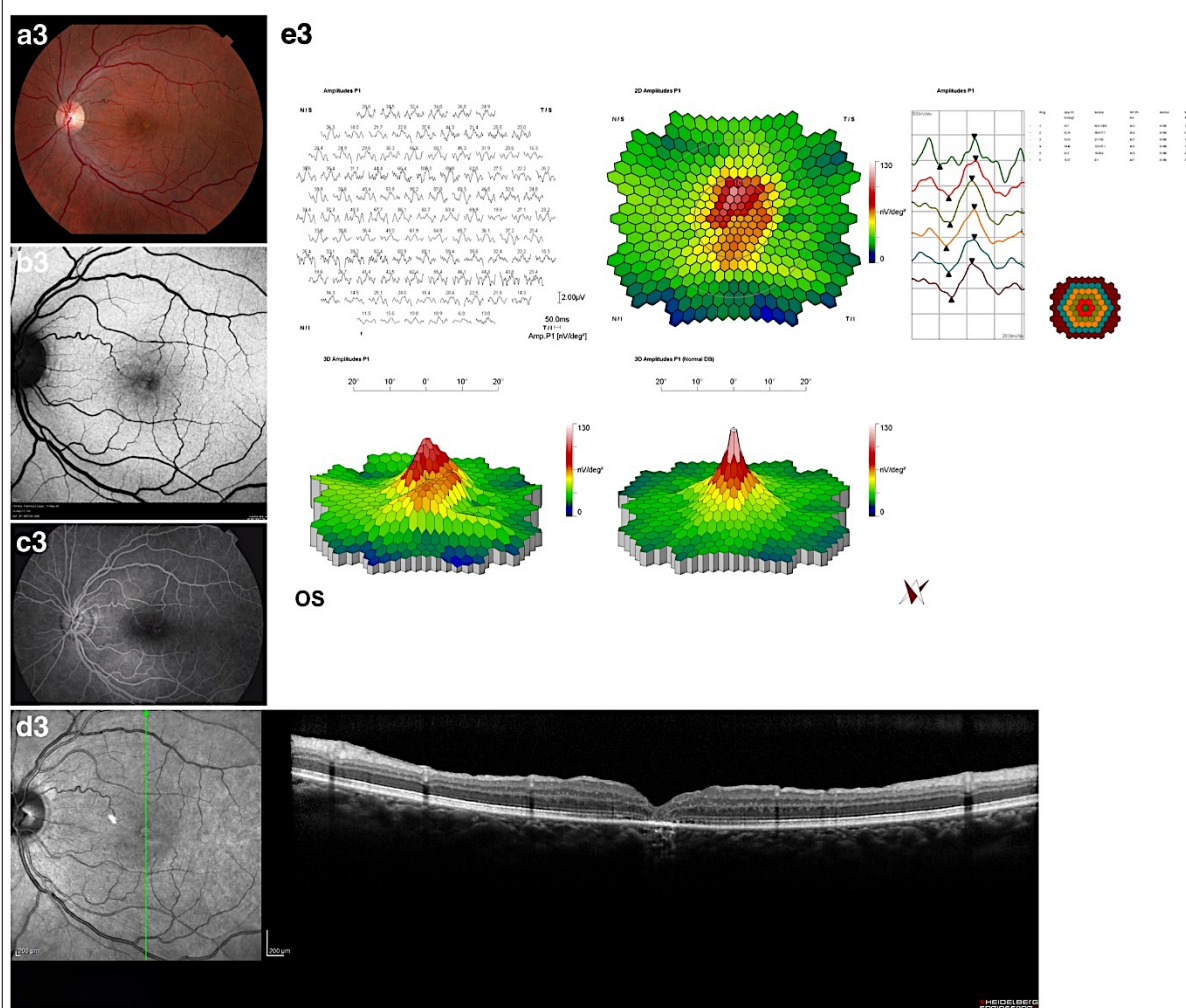


Fig. 4 (continued)

isolated, non-progressive finding and the literature shows that changes in the mfERG in rings 2 to 6 postoperatively may be related to surgical trauma [29–31], the current scientific data result in the assumption that ERG abnormalities also might be related to surgical trauma.

The fERG also was used to evaluate dye toxicity. Scotopic 0.01 ERG and scotopic 3.0 ERG results from baseline to 30 days showed values that can be associated with surgical trauma. However, data obtained from 30 to 180 days showed consistent improvement based on the decreased inflammatory response. Overall, the fERG patterns suggested the absence of toxicity related to the acai dye. Although a control group (no dyes during ILM peeling) would enrich the data obtained in this study, establishing a control group in which the dye was not used would be technically difficult and the

risks of macular trauma associated with ERG abnormalities would be enhanced [31–33].

The surgeons reported that pigmentation occurred on the ILM, core vitreous, and posterior hyaloid and no other structures were stained. Dye impregnation of the vitreous occurred in 24 (96%) of 25 procedures and 22 (88%) of 25 procedures for the ILM (Appendix). Dye deposition in the vitreous, i.e., core and posterior hyaloid, received scores of 7.0 ± 1.0 and 8.8 ± 1.4 , respectively, while the score for ILM visibility after dye injection was 7.1 ± 1.5 .

Although 12% of the surgeons did not believe the dye adequately stained the ILM compared with their previous experience with BBG, all surgeons believed that the dye was useful for vitreoretinal surgery.

The lack of a control group using a commercially available dye such as BBG is a study limitation. However, testing would

Table 1 Amplitudes and implicit times for full-field electroretinography (mean \pm SD)

	Baseline	30 days follow-up	6 months follow-up	<i>p</i> value
Scotopic 0.01 ERG				
b-wave amplitude (μ V)	216.51 \pm 96.22 ^A	182.66 \pm 91.02 ^B	213.18 \pm 85.6 ^A	0.021
b-wave implicit time (ms)	90.26 \pm 6.82 ^B	96.05 \pm 7.69 ^A	93.48 \pm 9.65 ^B	0.021
Scotopic 3.0 ERG				
a-wave amplitude (μ V)	223.92 \pm 80.75	217.48 \pm 67.48	227.16 \pm 62.86	0.551
a-wave implicit time (ms)	20.53 \pm 2.36 ^C	22.80 \pm 2.22 ^A	21.84 \pm 2.27 ^B	< 0.001
b-wave amplitude (μ V)	399.76 \pm 99.23	404.88 \pm 117.53	418.28 \pm 97.53	0.350
b-wave implicit time (ms)	52.06 \pm 6.36	53.67 \pm 6.71	52.21 \pm 6.09	0.412
Photopic 3.0 ERG				
b-wave amplitude (μ V)	115.58 \pm 28.62	114.49 \pm 35.17	114.99 \pm 36.92	0.665 ^a
b-wave implicit time (ms)	32.16 \pm 2.04 ^{B'}	33.33 \pm 4.38 ^{A'}	33.23 \pm 1.86 ^{A'}	0.010 ^a

N = 25. *p*—ANOVA descriptive level for repetitive measurements of Friedman (*). (A), (B), and (C) present different averages according to ANOVA contrasts. (A') and (B') present different averages according to multiple Dunn-Bonferroni comparisons

not be bias-free due to the previous experience these surgeons already would have had with the commercially available dye. Second, standardizing chronicity and the sizes of the MHs between groups would be difficult. Third, this would only be possible with a large number of eyes. Finally, the primary outcome of this study was to determine the usefulness of the dye to stain the posterior hyaloids and ILMs. The comparison of the efficiency of the acai dye with the surgeons' experiences using other commercially available dyes would only be additional information.

Moreover, surgeons had at least 5 years of experience using other dyes in chromovitrectomy and no previous training before using the current dye; therefore, a learning curve is expected using the acai dye. Despite this, the usefulness of the

dye received an average score of 7.4 ± 1.4 , indicating its potential use in chromovitrectomy.

During a preliminary investigation of the acai dye in 78 cadaveric eyes, purple staining occurred a few seconds after the dye came into contact with the neurosensory retina and more intense staining of the ILM was observed between 2 and 3 min before dye removal [9]. In the current study, the decision to allow the dye to remain on the retinal surface for 5 min was based on the protocols of previous studies [8, 23] and was supported by preclinical findings [9, 14]. To our knowledge, no commercially available dye has a well-defined "optimal time for staining." Future studies can answer that question.

Vital dyes have been described as small chemical substances that pass freely through retinal tissue and exacerbate retinal

Table 2 Amplitudes and implicit times changes for multifocal electroretinography at six rings of eccentricity (mean \pm SD)

	Baseline	30 days follow-up	6 months follow-up	<i>p</i> value
Amp. P1 nV/deg ²				
Ring1	49.64 \pm 20.1 ^B	59.07 \pm 29.21	66.03 \pm 30.96 ^A	0.014
Ring2	48.86 \pm 12.1	48.34 \pm 13.23	52.70 \pm 15.25	0.211
Ring3	43.70 \pm 8.80	40.79 \pm 10.15	43.63 \pm 10.59	0.257
Ring4	31.58 \pm 7.54	30.31 \pm 6.94	32.43 \pm 6.92	0.320
Ring5	25.24 \pm 5.44	24.48 \pm 6.14	25.49 \pm 6.06	0.624
Ring6	20.55 \pm 4.82	18.94 \pm 5.55	20.16 \pm 5.57	0.207
Pe T.P1				
Ring1	42.94 \pm 7.30	43.54 \pm 6.99	44.91 \pm 3.89	0.297 ^a
Ring2	44.01 \pm 2.58 ^B	45.99 \pm 2.37 ^A	45.45 \pm 2.64 ^A	< 0.001
Ring3	43.43 \pm 2.12 ^B	45.56 \pm 2.76 ^A	45.00 \pm 2.84 ^A	< 0.001
Ring4	43.20 \pm 2.36 ^B	45.36 \pm 2.81 ^A	44.82 \pm 2.89 ^A	< 0.001
Ring5	43.32 \pm 1.99 ^B	45.55 \pm 2.66 ^A	45.08 \pm 2.68 ^A	< 0.001
Ring6	43.32 \pm 2.06 ^B	45.93 \pm 2.80 ^A	45.30 \pm 2.92 ^A	< 0.001

N = 25. *p*—ANOVA descriptive level for repetitive measurements of Friedman (*). (A), (B) present different averages according to ANOVA contrasts

phototoxicity from intraoperative light exposure. It has been suggested that photosensitizing dyes enhance phototoxicity by increasing the levels of free radicals, creating a photoproduct that could be harmful to retinal cells and shifting light absorbance from one retinal site to another. We believe that because the acai fruit has a high anthocyanin concentration, it might have a physiologic antioxidant effect [11–13, 15, 17, 18]. Ongoing studies are evaluating the antioxidant capacity and safety profile of the acai dye in vitro and the possible protective effect on the ocular structures, especially for RPE cells.

Another important potential advantage of the dye from the acai fruit is that it is heavier than BSS, which results in gentle deposition onto the posterior pole by turning off the infusion and positioning the soft-tip cannula at the center of the vitreous cavity. This step avoids dye flushing into the posterior pole [7].

Despite the study limitations, the preliminary results showed that the new dye extracted from the acai fruit at a 25% concentration identified the posterior hyaloids and ILMs during PPVs in humans. Dye toxicity was unlikely. Although long-term follow-up and additional studies are necessary, the initial results suggested that the acai dye may be useful for chromovitrectomy in the future.

Acknowledgments Vision Institute (IPEPO) and Ophthalmos Pharmaceutical Industry.

Funding This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- 402718/2013-5), Brasília, Brazil, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2014/07686-8), São Paulo, Brazil.

Compliance with ethical standards

This prospective, interventional, non-randomized clinical study was registered at clinicaltrials.gov (NCT02691429). The consort flow diagram and checklist are available (Supplemental Digital Content 1). The Ethics Committee of the Federal University of São Paulo (Institutional Review Board number 466.833) and the National Brazilian Council of Research (CONEP authorization number 1.139.211) approved the study, which was conducted according to the Research Guidelines of the Association of Research in Vision Ophthalmology and the Declaration of Helsinki. To avoid BIAS during data interpretation, 10 surgeons performed 25 procedures following an aleatory protocol defined by the Ethics Committee of the Federal University of São Paulo. All patients provided informed consent regarding the benefits and risks of the surgical procedure and the new dye tested.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the UNIFESP and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

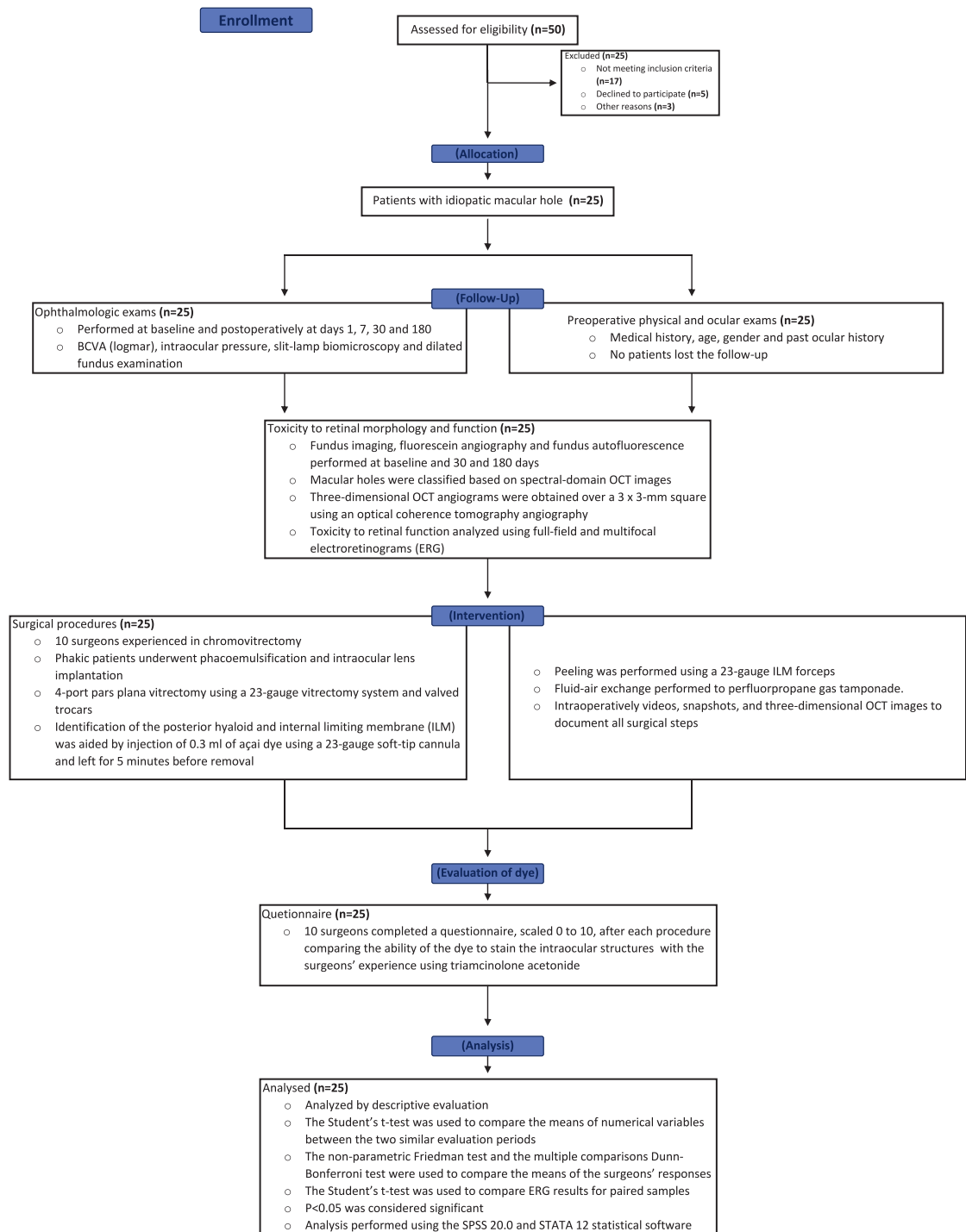
References

- Burk SE, Da Mata AP, Snyder ME, Rosa RH Jr, Foster RE (2000) Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane. *Ophthalmology* 107:2010–2014
- Gandorfer A, Haritoglou C, Gass CA, Ulbig MW, Kampik A (2001) Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage. *Am J Ophthalmol* 132:431–433
- Engelbrecht NE, Freeman J, Sternberg P Jr, Aaberg TM Sr, Aaberg TM Jr, Martin DF et al (2002) Retinal pigment epithelial changes after macular hole surgery with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 133:89–94
- Maia M, Kellner L, de Juan E Jr, Smith R, Farah ME, Margalit E et al (2004) Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into the subretinal space in rabbits. *Retina* 24:80–91
- Maia M, Margalit E, Lakhnani R, Tso MO, Grebe R, Torres G et al (2004) Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina* 24:69–79
- Yuen D, Gonder J, Proulx A, Liu H, Hutnik C (2009) Comparison of the in vitro safety of intraocular dyes using two retinal cell lines: a focus on brilliant blue G and indocyanine green. *Am J Ophthalmol* 147:251–9 e2
- Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB (2009) Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling. *Br J Ophthalmol* 93:1687
- Farah ME, Maia M, Rodrigues EB (2009) Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol* 148:332–340
- Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves Ferreira RE, de Moraes Filho MN et al (2013) Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*) and 10 other natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes. *Retina* 33:89–96
- Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira EL, Maia A et al (2013) Color variation assay of the anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*): a potential new dye for vitreoretinal surgery. *J Ocul Pharmacol Ther* 29(8):746–753
- Kahkonen MP, Heinonen M (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 51:628–633
- Rahman MM, Ichihara T, Komiyama T, Hatano Y, Konishi T (2006) Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic Res* 40:993–1002
- De Rosso VV, Moran Vieyra FE, Mercadante AZ, Borsarelli CD (2008) Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radic Res* 42:885–891
- Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais E, Badaro E et al (2017) Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe Oleracea*) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. *Curr Eye Res* 42(8):1185–1193
- Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST (2004) Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem* 52:1539–1545
- Peris CS, Caiado RR, Lima-Filho AAS, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves M, et al. (2018) Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): a potential novel vital dye for chromovitrectomy. *J Ophthalmol* 2018:1–9
- Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J et al (2006) Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem* 54:8604–8610
- Jang YP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JR (2005) Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 81:529–536

19. Rizzo S, Savastano A, Bacherini D, Savastano MC (2017) Vascular features of full-thickness macular hole by OCT angiography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 48:62–68
20. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS et al (2012) ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol* 124:1–13
21. McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, Hamilton R, Holder GE, Tzekov R et al (2015) ISCEV standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc Ophthalmol* 130:1–12
22. Badaro E, Furlani B, Prazeres J, Maia M, Lima AA, Souza-Martins D et al (2014) Soluble lutein in combination with brilliant blue as a new dye for chromovitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 252:1071–1078
23. Maia M, Furlani BA, Souza-Lima AA, Martins DS, Navarro RM, Belfort R Jr (2014) Lutein: a new dye for chromovitrectomy. *Retina* 34:262–272
24. Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottos J, Dib E et al (2009) The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv Ophthalmol* 54: 576–617
25. Henrich PB, Priglinger SG, Haritoglou C, Josifova T, Ferreira PR, Strauss RW et al (2011) Quantification of contrast recognizability during brilliant blue G- and indocyanine green-assisted chromovitrectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:4345–4349
26. Caiado RR, Moraes-Filho MN, Maia A, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M (2014) State of the art in chromovitrectomy. *Rev Bras Oftalmol* 73:363–376
27. Rodrigues EB, Maia M, Meyer CH, Penha FM, Dib E, Farah ME (2007) Vital dyes for chromovitrectomy. *Curr Opin Ophthalmol* 18: 179–187
28. Rodrigues EB, Penha FM, de Paula Fiod Costa E, Maia M, Dib E, Moraes M Jr et al (2010) Ability of new vital dyes to stain intraocular membranes and tissues in ocular surgery. *Am J Ophthalmol* 149:265–277
29. Tari SR, Vidne-Hay O, Greenstein VC, Barile GR, Hood DC, Chang S (2007) Functional and structural measurements for the assessment of internal limiting membrane peeling in idiopathic macular pucker. *Retina* 27:567–572
30. Lim JW, Cho JH, Kim HK (2010) Assessment of macular function by multifocal electroretinography following epiretinal membrane surgery with internal limiting membrane peeling. *Clin Ophthalmol* 4:689–694
31. Chatziralli IP, Theodossiadis PG, Steel DHW (2018) Internal limiting membrane peeling in macular hole surgery; why, when, and how? *Retina* 38:870–882
32. Eckardt C, Eckardt U, Groos S, Luciano L, Reale E (1997) Removal of the internal limiting membrane in macular holes. Clinical and morphological findings. *Ophthalmologie* 94:545–551
33. Mester V, Kuhn F (2000) Internal limiting membrane removal in the management of full-thickness macular holes. *Am J Ophthalmol* 129:769–777

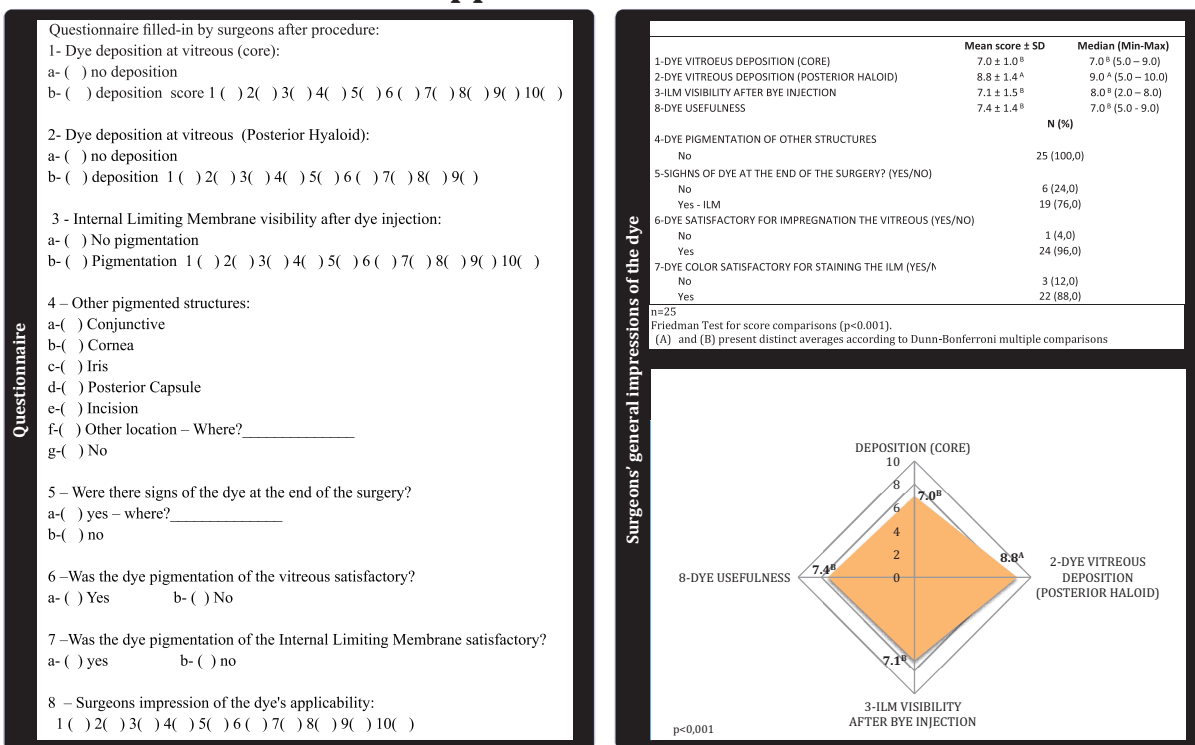
(Supplemental Digital Content 1)

CONSORT Flow Diagram



(Appendix / Supplemental Digital Content 3)

Supplemental Material



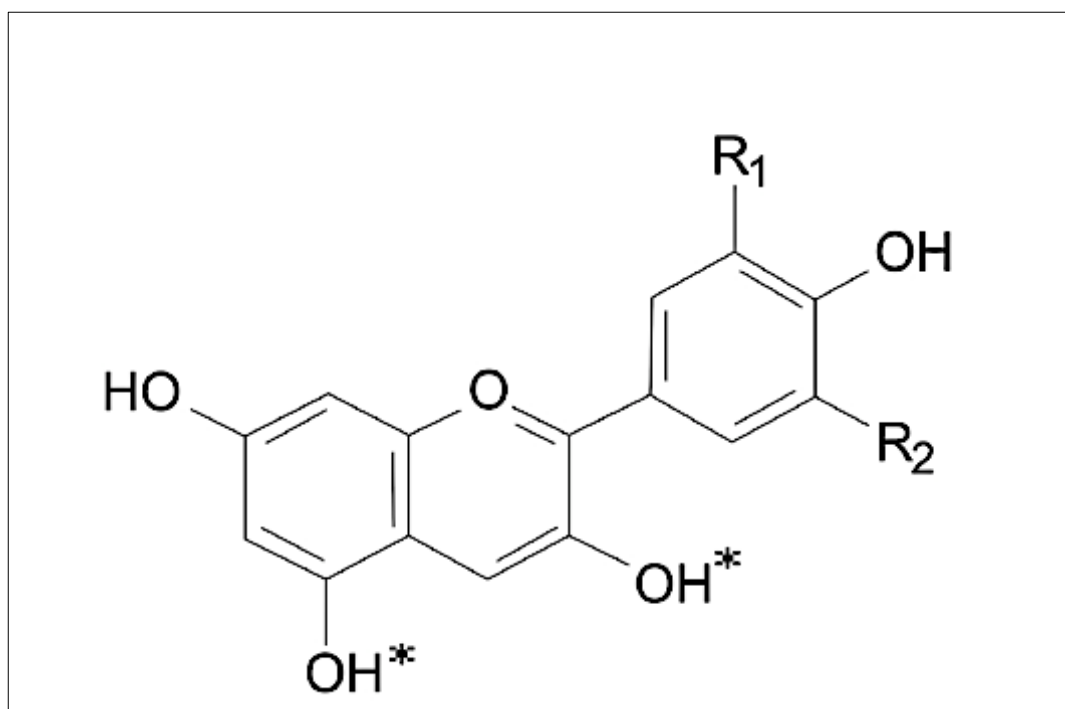
4 DISCUSSÃO

A aplicabilidade do pigmento extraído do fruto do açaí como corante usado em cromovitrectomia foi avaliada quanto à sua composição antioxidante, à sua eficiência em pigmentar seletivamente as estruturas transparentes do olho e à sua toxicidade morfofuncional, inicialmente em coelhos, e, posteriormente, em humanos. A linha de pesquisa deu origem a três publicações:

- Artigo 1: *Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (Euterpe oleracea): A Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy;*
- Artigo 2: *Retinal Toxicity of Acai Fruit (Euterpe oleracea) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans;* e
- Artigo 3: *A New Dye Based on Anthocyanins from the Acai Fruit (Euterpe oleracea) for Chromovitrectomy in Humans: Clinical Trial Results.*

4.1 Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): a Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy.

Antocianinas são flavonoides, um metabolito secundário de plantas que contêm, em sua estrutura geral, dois anéis fenil e um anel heterocíclico (Figura 1). Já foi descrito que o poder antioxidante dos flavonoides reduz a oxidação proteica e aumenta a expressão da enzima paraoxanase 2 em macrófagos.⁽²⁷⁻³³⁾ As antocianinas são um dos principais componentes do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*). Além disso, a capacidade antioxidante equivalente ao trolox do fruto do açaí (48,6 μmol Trolox equivalentes/mL) é maior do que a de diversas frutas, como o morango e a uva.⁽³⁴⁾



Fonte: Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): A potencial novel vital dye for chromovitrectomy. J Ophthalmol. 2018;2018:6830835

Figura 1. Estrutura molecular básica das antocianinas

Especula-se que as antocianinas apresentam um efeito antioxidante ao quelarem o oxigênio singlete, o qual seria liberado por corantes irradiados pela luz durante a cromovitrectomia.^(32,35) Portanto, a presença de antocianinas no pigmento extraído do fruto do açaí pode estar associada à baixa toxicidade do corante desenvolvido.

O objetivo do primeiro artigo foi caracterizar e quantificar as antocianinas presentes no pigmento extraído do fruto do açaí. Para isso, foram usadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrometria de massa (MS). As técnicas revelaram a presença de cinco moléculas diferentes de antocianinas, independentemente da concentração do corante do açaí, na seguinte proporção: cianidina-3-O-glucosídeo > homoorientina > orientina > taxifolina > isovitexina (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação das antocianinas com base no tempo de retenção da área, o qual foi analisado por CLAE nas diferentes concentrações

Antocianinas	Concentração -10%	Concentração -25%	Concentração -35%
Cianidina-3-O-glucosídeo			
Tempo de retenção (minutos)	9.987	9.980	9.973
Área (ml)	23.909	24.410	23.886
Homoorientina			
Tempo de retenção (minutos)	10.380	10.380	10.380
Área (ml)	38.511	36.950	40.106
Orientina			
Tempo de retenção (minutos)	10.587	10.593	10.580
Área (ml)	22.945	22.784	23.988
Taxifolina			
Tempo de retenção (minutos)	11.673	11.667	11.667
Área (ml)	0.966	0.894	0.998
Isovitexina			
Tempo de retenção (minutos)	10.893	10.893	10.880
Área (ml)	6.755	6.737	6.194

Fonte: Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): A potencial novel vital dye for chromovitrectomy. J Ophthalmol. 2018;2018:6830835.

O resultado obtido nesse trabalho serviu de base para identificar e, então, compreender melhor as antocianinas presentes no corante extraído do fruto do açaí. Trabalhos futuros poderão analisar o efeito antioxidante dessas antocianinas e como a ação destas está ou não ligada à baixa toxicidade morfológica e funcional do corante durante a cromovitrectomia.

4.2 Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans

O objetivo desse estudo foi testar a toxicidade de diferentes concentrações (10%, 25% e 35%) do pigmento extraído do fruto do açaí, usando um modelo em coelhos.

Para avaliar a toxicidade funcional do corante, realizamos uma ERG (Figura 2) enquanto a toxicidade morfológica foi mensurada ao proceder aos seguintes exames: fundoscopia, angiografia fluoresceínica (AFG), tomografia de coerência óptica (OCT), LM e microscopia eletrônica de transmissão (MET).



Fonte: do autor.

Figura 2. Sumário de todo o sistema utilizado para realização da eletroretinografia. Os três eletrodos estão em destaque e posicionados à direita do coelho - A. eletrodo estimulador posicionado na córnea do animal; B. eletrodo negativo posicionado periocular; C. eletrodo terra posicionado na orelha do animal.

A interpretação dos resultados da ERG (Tabela 2) revelou que as amplitudes na fase escotópica de 0,01 ERG e de 3,0 ERG para a concentração de 35%, após 24 horas, apresentaram valores significativamente mais baixos em microvolts comparados ao SBB ($p < 0,05$). Após 7 dias, os valores de todas as concentrações tenderam à recuperação.

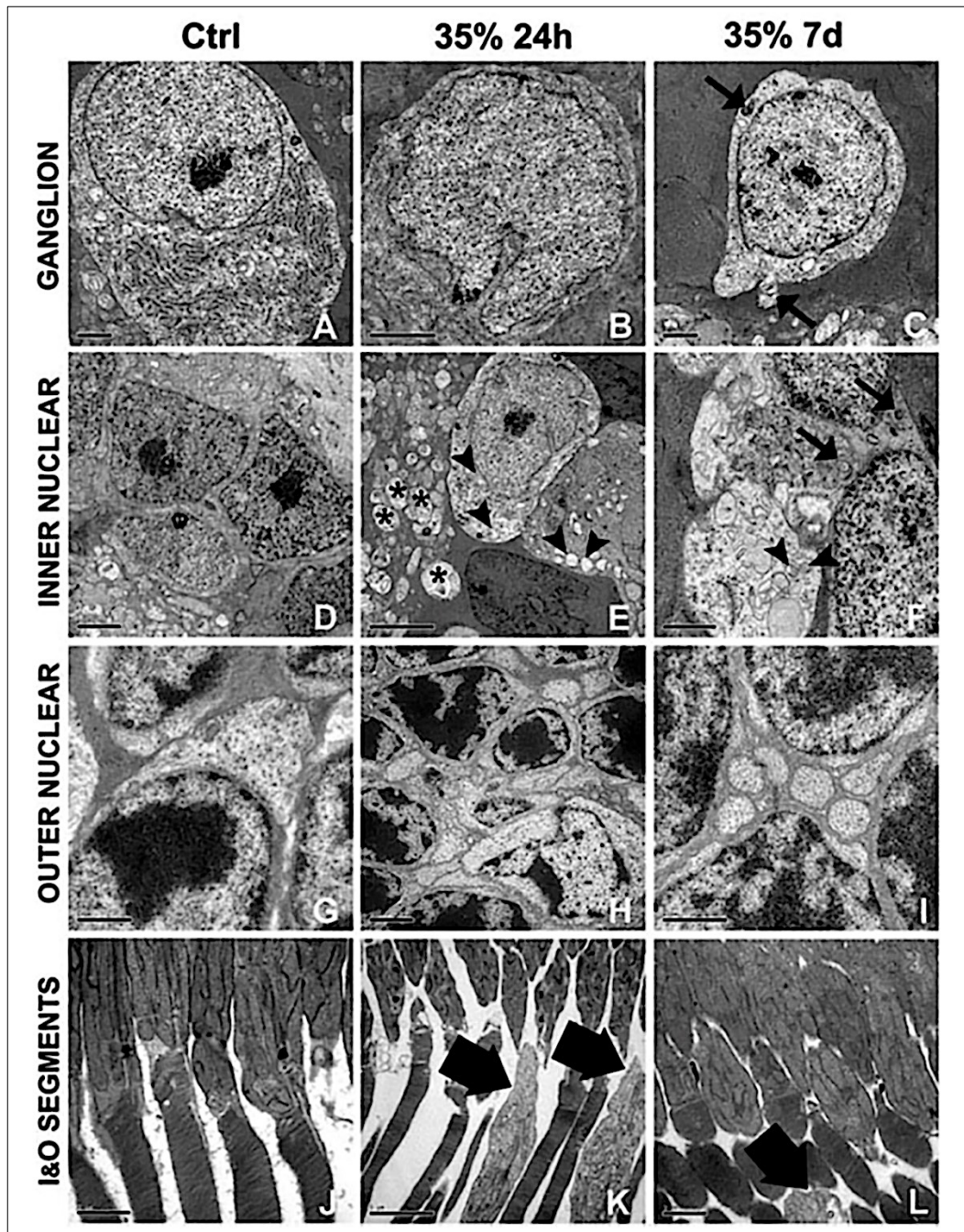
Tabela 2. Descrição e análise comparativa (Kruskal-Wallis) da eletroretinografia de campo total em coelhos, após 7 dias da injeção intravítrea de SSB nos olhos controle e de diferentes concentrações do corante do Açaí nos olhos testados

Fase escotópica 0,01 ERG		SSB	10%	25%	35%	$p (<0.05)$
onda-b	Amplitude (μV)	165(87-210)	150(120-220)	173(65-280)	110(58-250)	0.879
	Tempo implícito (ms)	60(50-60)	60(20-70)	65(60-70)	65(60-80)	0.083
Fase escotópica 3,0 ERG		SSB	10%	25%	35%	$p (<0.05)$
onda-a	Amplitude (μV)	8(2-12)	8(8-20)	5(5-5)	10(9-10)	0.204
	Tempo implícito (ms)	25(12-25)	25(25-25)	25(25-25)	25(25-25)	0.801
onda-b	Amplitude (μV)	175(144-265)	225(170-280)	227(190-265)	155(138-180)	0.135
	Tempo implícito (ms)	50(20-50)	45(45-50)	43(40-45)	50(34-53)	0.659

Fonte: Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais EA, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SE, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in Rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. Curr Eye Res. 2017;42(8):1185-93.

Valores médios (mínimo e máximo) obtidos 7 dias após a injeção intravítrea

A MET apresentou anormalidades associadas apenas na concentração de 35% (Figura 3). Esses dados preliminares sugerem que a concentração do corante extraído do fruto do açaí tem toxicidade celular. Por outro lado, as concentrações de 10% e 25% não apresentaram esse perfil de toxicidade.



Fonte: Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais EA, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SE, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in Rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. *Curr Eye Res.* 2017;42(8):1185-93.

Figura 3. Achados retinianos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) 24 horas e 7 dias nos olhos controle e após injeção intravítrea do corante a 35% do corante à base do fruto do açaí. Diferentes camadas retinianas mostradas para representar os olhos controle e após 24 horas e 7 dias. Vinte e quatro horas após a injeção intravítrea, há um discreto edema de células ganglionares e desarranjo mitocondrial (B). A presença de corpos multilamelares mais proeminentes com 7 dias (C-seta). Na camada nuclear interna, observa-se danos nos feixes nervosos (E -asterisco), alteração mitocondrial (E e F - Cabeça da seta) e abundantes corpos multilamelares (F - seta). Ausência de anormalidades observadas na camada nuclear externa (H, I). Os segmentos internos e externos dos fotorreceptores não apresentaram anormalidades relevantes, mas houve um desarranjo na crista mitocondrial no segmento interno dos fotorreceptores com 24 horas (K - seta larga), sendo observado com menor expressão com 7 dias (L - seta larga)

A retinografia revelou que a opacidade vítrea diminuiu de modo progressivo, independentemente da concentração, sugerindo que o corante é eliminado pelos tecidos oculares com eficiência. AFG não revelou alteração da fluorescência ou anormalidades vasculares independentemente da concentração do corante. Achados histológicos (LM e MET) revelaram que as pequenas alterações da retina (variabilidade fisiológica), apresentadas pelos corantes nas concentrações de 10% e 25%, não mostram achados diferentes do apresentado pela Solução Salina Balanceada (SSB). A exceção foi para a concentração de 35%, que demonstrou edema celular em células ganglionares e no segmento externo de fotorreceptores. A OCT foi negativa para edema ou atrofia retiniana, com imagens semelhantes às encontradas em olhos contralaterais.

Os resultados morfológicos corroboraram os achados de ERG e sugerem que o corante extraído do fruto do açaí é seguro para uso em coelhos na concentração de 10% e 25%. No entanto, a concentração de 35% foi associada à toxicidade funcional e morfológica.

A biocompatibilidade de outros corantes também já provou ser dose dependente.⁽³⁴⁾ Estudos futuros poderão comparar a toxicidade funcional e morfológica do corante extraído do fruto do açaí a outros corantes atualmente comercializados.

A limitação mais evidente desse estudo foi o fato de ser realizado em coelhos. As cavidades vítreas desses animais são menores e suas retinas são mais finas do que as de humanos. Por esse motivo, os resultados de toxicidade obtidos podem até ser maiores do que se realizados em olhos humanos.

Outra limitação do estudo foi o fato de o corante ter sido injetado em olhos de coelhos não vitrectomizados. Em olhos assim, o corante entrará em contato direto com a retina. Dessa forma, em humanos, o corante também entrará em contato direto com a retina e poderá resultar em maior toxicidade. Por outro lado, em humanos o corante é aspirado ao final da cirurgia e não permanece dentro do olho por tanto tempo, conforme ocorreu no estudo com coelhos.

Considerando essas limitações, o atual estudo em coelhos serviu de base para o estudo clínico realizado em humanos. Foi possível concluir que o corante extraído do fruto do açaí nas concentrações de 10% e 25% não causaram toxicidade funcional nem morfológica em coelhos.

4.3 A New Dye Based on Anthocyanins from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) for Chromovitrectomy in Humans: Clinical Trial Results

A busca de um corante ideal para cromovitrectomia tem como base um pigmento que fosse viável e seguro ao mesmo tempo. Os objetivos deste estudo foram, portanto, avaliar a viabilidade e a segurança do uso do corante composto por antocianinas extraídas do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) na concentração de 25% em humanos que apresentavam a indicação cirúrgica para cromovitrectomia.

O preparo do corante foi realizado pela Ophthalmos Indústria Farmacêutica S/A, certificada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apesar de o estudo anterior ter revelado que ambas as concentrações de 10% e 25% foram seguras em coelhos, a investigação atual foi realizada com a concentração mais alta em razão de sua maior capacidade de pigmentação. Outros parâmetros estabelecidos para obtermos um corante biocompatível com o ambiente ocular foram a osmolaridade (300 mOsm), o pH (7) e a densidade (1,1). O processo de liofilização foi necessário por conta da instabilidade da cor.

Para analisar o perfil de segurança do corante extraído do açaí a 25%, realizamos avaliações anatômicas e funcionais. A fim de avaliar a viabilidade desse corante, foi investigada a capacidade de impregnação deste na hialoide posterior e na MLI por meio de preenchimento do questionário respondido pelo cirurgião após a utilização.

Os achados anatômicos obtidos nos exames de autofluorescência, angiofluoresceinografia, tomografia de coerência óptica e angiotomografia por coerência óptica não mostraram anormalidades anatômicas sugestivas de toxicidade no seguimento de 180 dias de pós-operatório.

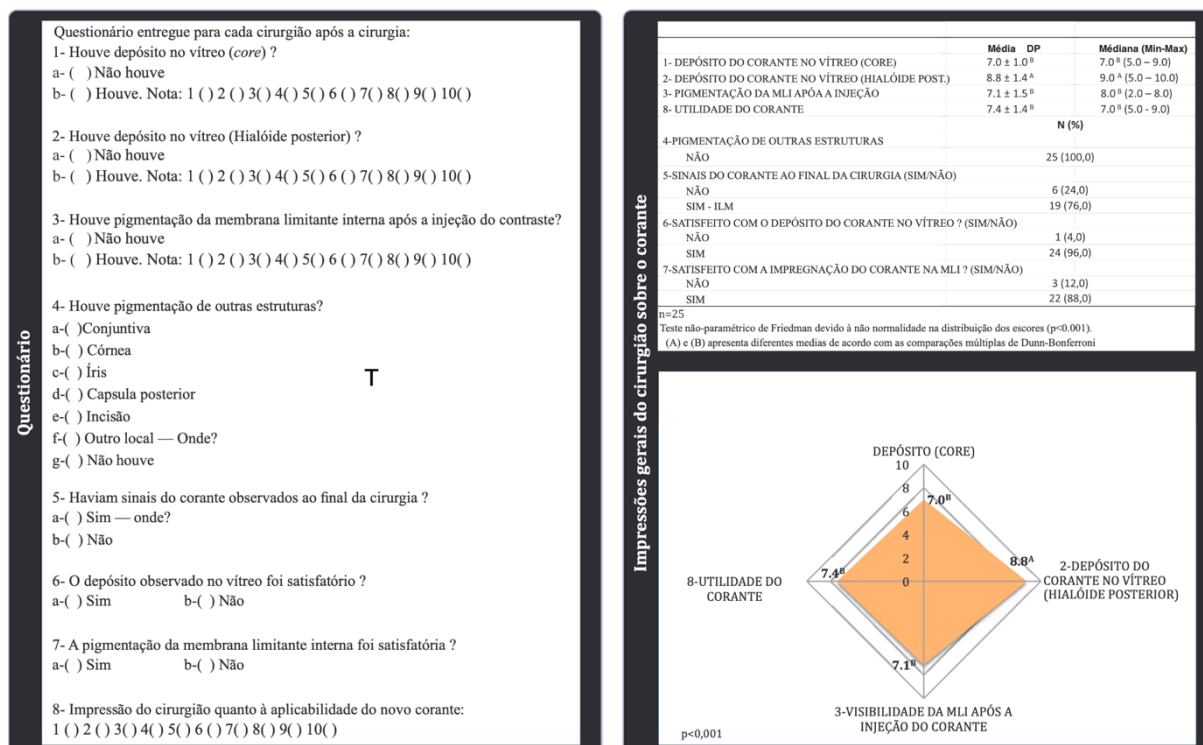
A taxa de fechamento do buraco macular foi de até 76% e todos os 25 olhos foram considerados pseudofácicos. Essa taxa de fechamento é semelhante à de outros estudos que também avaliam buracos maculares crônicos no pós-operatório.^(35,36) Dessa forma, o número de casos com fechamento do buraco macular sugere não haver relação com uma possível toxicidade do corante.

Neste estudo, os achados funcionais foram obtidos ao medir a acuidade visual e ao registrar a ERG multifocal. A acuidade visual média melhorou estatisticamente ($p < 0,001$) desde o pré-operatório ($1,37 \pm 0,29$) até 180 dias pós-operatório ($1,05 \pm 0,43$). No entanto, a melhora limitada da acuidade visual pode estar relacionada à cronicidade

dos casos. A ERG multifocal é um exame mais objetivo e sensível do que o da acuidade visual para avaliar os resultados funcionais. A ERG multifocal mostrou que os valores médios de amplitude para o anel 1 e a análise do tempo implícito P1 melhoraram progressivamente em relação ao *baseline* para 180 dias. Esse resultado provavelmente deveu-se a uma melhora anatômica foveal após o fechamento macular. As médias das amplitudes dos anéis 2 ao anel 6 e do tempo implícito P1 apresentaram um aumento desde o *baseline* até 30 dias e não mudaram significativamente de 30 para 180 dias. Esse aumento, embora não clinicamente importante, pode ser resultado de trauma cirúrgico causado pelo *peeling* da MLI, demonstrando ser improvável a possibilidade de efeitos tóxicos relacionados ao novo corante.

A ERG de campo total também foi utilizada para avaliar a toxicidade do corante. A ERG escotópica 0,01 e a ERG escotópica 3,0, *baseline* até 30 dias, mostraram valores que podem estar associados a trauma cirúrgico, isto é, à presença do gás perfluoropropano na cavidade vítrea e à resposta inflamatória pós-operatória. No entanto, os dados obtidos de 30 a 180 dias apresentaram melhora consistente com base na diminuição da resposta inflamatória. Em geral, os padrões ERG de campo total sugeriram ausência de toxicidade associada ao corante de açaí.

A análise dos questionários (Figura 4) revelou que a pigmentação foi seletiva e ocorreu para MLI, *core vitreous* e hialoide posterior. A pigmentação do vítreo (*core* e hialoide posterior) ocorreu em 24 de 25 procedimentos (escore de $7,0 \pm 1,0$ e $8,8 \pm 1,4$, respectivamente) e para a MLI em 22 de 25 procedimentos (escore $7,1 \pm 1,5$). Os cirurgiões também classificaram a aplicabilidade do corante com a nota de $7,4 \pm 1,4$. É importante ressaltar que, apesar de os cirurgiões serem experientes com outros corantes, eles nunca haviam operado usando o corante extraído do açaí. É razoável considerar que esses resultados poderão receber pontuação ainda mais alta após a realização de mais casos empregando o novo corante.



Fonte: Caiado RR, Peris C, Rodrigues EB, Farah ME, Maia A, Magalhães O Jr, Novais E, Lima-Filho AS, Maia M. A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019 Jan 3. doi: 10.1007/s00417-018-04204-y. [Epub ahead of print].

Figura 4. Questionário, tabela e gráfico com perguntas e respostas dos cirurgiões após procedimentos usando o corante extraído do açaí

Uma observação clínica importante foi o fato de o corante extraído do açaí ser mais pesado que o SSB. Essa característica resulta na sua cuidadosa deposição no polo posterior ao desligar a infusão e posicionar a ponta da cânula no centro da cavidade vítrea. Esse passo evita manobras agressivas, como o *flushing* do corante sobre o polo posterior. Outra possível vantagem do corante é que o fruto do açaí é acessível e, portanto, a produção em larga escala desse produto poderá resultar em um corante mais econômico em comparação aos comercializados atualmente. Além disso, diferente dos corantes atualmente empregados (PubMed, fevereiro, 2018), todos os passos da cromovitrectomia podem ser realizados usando apenas um corante, já que ele pigmenta tanto a hialóide posterior como a MLI.

Finalmente, apesar de esse estudo ser a última etapa de uma linha de pesquisa extensa que avaliou o corante extraído do fruto do açaí, estudos adicionais devem ser realizados para acompanharmos um maior número de pacientes por um período maior. De acordo com o estudo atual, o corante extraído do açaí a 25% foi seguro e viável para ser empregado em cromovitrectomia em humanos.

4.4 Perspectivas Futuras

Apesar dos resultados promissores em relação ao corante extraído do fruto do açaí em cromovitrectomia, novas pesquisas laboratoriais e clínicas deverão ser desenvolvidas. Duas principais linhas de pesquisa devem ser iniciadas. A primeira voltada para compreender melhor o papel antioxidante das antocianinas presentes no corante e de que maneira essa característica pode estar relacionada à sua baixa toxicidade celular. A segunda linha deverá tomar uma abordagem clínica, voltada para a comparação do corante extraído do fruto do açaí com outros corantes atualmente comercializados.

O aprofundamento do entendimento das propriedades químicas e físicas do corante extraído do fruto do açaí poderá tornar esse corante um produto técnica e economicamente mais interessante do que outras substâncias empregadas hoje em dia em cromovitrectomia.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

A linha de pesquisa atual revelou que o corante extraído do fruto do açaí, na concentração de 25%, é seguro e viável para ser usado em cromovitrectomia em humanos.

As vantagens do emprego desse novo corante são as seguintes:

- (1) O açaí possui uma alta composição de antocianinas (cianidina-3-O-glucosídeo > homoorientina > orientina > taxifolina > isovitexina).
- (2) Avaliações anatômicas e funcionais em coelhos não mostrou sinais de toxicidade do corante na concentração de 10% e 25%.
- (3) Todos os passos da cromovitrectomia podem ser realizados usando apenas um corante. Além disso, por ser mais pesado do que a SSB, o corante extraído do açaí evita manobras agressivas, como o *flushing*. O corante também se mostrou seguro e eficaz em cromovitrectomia em humanos.

5.1 Considerações finais

O corante extraído do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) é uma alternativa segura e eficiente para o uso em cromovitrectomia. Novas pesquisas clínicas e laboratoriais poderão aprofundar seu desempenho clínico e sua ação antioxidante na toxicidade celular.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

1. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A. Resolution of diabetic macular edema after surgical removal of the posterior hyaloid and the inner limiting membrane. *Retina*. 2000;20(2):126-33.
2. La Heij EC, Hendrikse F, Kessels AG, Derhaag PJ. Vitrectomy results in diabetic macular oedema without evident vitreomacular traction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001 Apr;239(4):264-70.
3. Rodrigues EB, Meyer CH, Kroll P. Chromovitrectomy: a new field in vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005 Apr;243(4):291-3.
4. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A. Indocyanine green selectively stains the internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol*. 2001 Mar;131(3):387-8.
5. Schmidt JC, Meyer CH, Rodrigues EB, Hoerle S, Kroll P. Staining of internal limiting membrane in vitreomacular surgery: a simplified technique. *Retina*. 2003 Apr;23(2):263-4; author reply 264.
6. Kiernan JA. Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech Histochem*. 2001 Sep-Nov;76(5-6):261-78.
7. Schulte EK. Standardization of biological dyes and stains: pitfalls and possibilities. *Histochemistry*. 1991;95(4):319-28.
8. Dib E, Rodrigues EB, Maia M, Meyer CH, Penha FM, Furlani BA, et al. Corantes vitais em cromovitrectomia. *Arch Bras Ophthalmol*. 2018 Feb 12;72(6):845-50.
9. Tadayoni R, Paques M, Girmens JF, Massin P, Gaudric A. Persistence of fundus fluorescence after use of indocyanine green for macular surgery. *Ophthalmology*. 2003 Mar;110(3):604-8.
10. Maia M, Kellner L, de Juan E Jr, Smith R, Farah ME, Margalit E, et al. Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into the subretinal space in rabbits. *Retina*. 2004 Feb;24(1):80-91.
11. Maia M, Margalit E, Lakhanpal R, Tso MO, Grebe R, Torres G, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina*. 2004 Feb;24(1):69-79.
12. Westermeier R. Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrylamide gels. *Proteomics*. 2006 Sep;6 Suppl 2:61-4.
13. Hisatomi T, Enaida H, Matsumoto H, Kagimoto T, Ueno A, Hata Y, et al. Staining ability and biocompatibility of brilliant blue G: preclinical study of

- brilliant blue G as an adjunct for capsular staining. *Arch Ophthalmol*. 2006 Apr;124(4):514-9.
14. Yuen D, Gonder J, Proulx A, Liu H, Hutnik C. Comparison of the in vitro safety of intraocular dyes using two retinal cell lines: a focus on brilliant blue G and indocyanine green. *Am J Ophthalmol*. 2009 Feb;147(2):251-259 e2.
 15. Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB. Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling. *Br J Ophthalmol*. 2009 Dec;93(12):1687.
 16. Peyman GA, Cheema R, Conway MD, Fang T. Triamcinolone acetate as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloid during pars plana vitrectomy. *Retina*. 2000;20(5):554-5.
 17. Caiado RR, Moraes-Filho MN, Maia A, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. State of the art in chromovitrectomy. *Rev. Bras. Oftalmol*. 2014 Dec;73(6):363-76.
 18. Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol*. 2009 Sep;148(3):332-40.
 19. Qin Y, Xia M, Ma J, Hao Y, Liu J, Mou H, et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr*. 2009 Sep;90(3):485-92.
 20. Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J*. 2011 May 12;10:45.
 21. Sun X, Seeberger J, Alberico T, Wang C, Wheeler CT, Schauss AG, et al. Acai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Exp Gerontol*. 2010 Mar;45(3):243-51.
 22. Yamaguchi KK, Pereira LF, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chem*. 2015 Jul 15;179:137-51.
 23. Kuskoski EM, Asuero, AG, García-Parilla, MC, Troncoso AM, Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology*. 2004 Oct/Dec;24(4):691-3.
 24. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006 Nov 1;54(22):8604-10.

25. Jang YP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JR. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol.* 2005 May-Jun;81(3):529-36.
26. De Rosso VV, Morán Vieyra FE, Mercadante AZ, Borsarelli CD. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radic Res.* 2008 Oct;42(10):885-91.
27. Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira EL, Maia A, et al. Color Variation Assay of the Anthocyanins from Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): A Potential New Dye for Vitreoretinal Surgery. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013 Oct;29(8):746-53.
28. Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves Ferreira RE, de Moraes Filho MN, et al. Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*) and 10 other natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes. *Retina.* 2013 Jan;33(1):89-96.
29. Qin C, Li Y, Zhang R, Niu W, Ding Y. Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mockstrawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Nat Prod Res.* 2009;23(17):1589-98.
30. Kähkönen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem.* 2003 Jan 29;51(3):628-33.
31. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem.* 2004 Mar 24;52(6):1539-45.
32. Rahman MM, Ichiyanagi T, Komiyama T, Hatano Y, Konishi T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic Res.* 2006 Sep;40(9):993-1002.
33. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999 May;26(9-10):1231-7.
34. Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottós J, Dib E, et al. The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv Ophthalmol.* 2009 Sep-Oct;54(5):576-617.
35. Willis AW, Garcia-Cosio JF. Macular hole surgery. Comparison of longstanding versus recent macular holes. *Ophthalmology.* 1996 Nov;103(11):1811-4.
36. Shukla SY, Afshar AR, Kiernan DF, Hariprasad SM. Outcomes of chronic macular hole surgical repair. *Indian J Ophthalmol.* 2014 Jul;62(7):795-8.

ANEXOS

Anexo 1. Comissão de Ética para o estudo laboratorial.

CEP Nº 4216091213 **Registrado em:** 12/12/2013

Título: "Caracterização das Antocianinas do Fruto do Açaí (EuterpeOleracea): Estudo da Interação Molecular das Antocianinas com a Membrana Limitante Interna "

Documentos anexados: 1.) 1. Projeto de Pesquisa

Data	Documento	Comentário do CEP	Status
12/12/2013	Projeto de Pesquisa	Estudo aprovado. (30/12/2013)	APROVADO

Recebido

Visualizar

Incluir doc

Sair

Anexo 2. Comissão de Ética no Uso de Animais**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

São Paulo, 23 de janeiro de 2014
CEUA N **2689281013**

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Rafael Ramos Caiado
Depto/Disc: Oftalmologia
Dr Mauricio Maia (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da toxicidade retiniana das antocianinas e proantocianidinas do fruto do Açaí (Euterpe orelacea) em coelhos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A cirurgia vitreoretiniana é uma cirurgia que envolve técnicas complexas e delicadas que tratam doenças como buraco macular (BM), membrana epirretiniana (MER) e o edema macular diabético. (1, 2) A cromovitrectomia é uma dessas técnicas que incluem o uso de corantes compostos de pigmentos vitais ou cristais para melhorar a visualização durante a cirurgia de vitrectomia. Uma boa impregnação do corante favorece o resultado cirúrgico por que facilita procedimentos como o peeling da membrana limitante interna (MLI) e da membrana epirretiniana (MER), além da remoção vítrea completa. (3-5)

Até o momento não há um corante estabelecido para ser utilizado em cirurgias vitreoretinianas. A busca de um corante ideal é baseada em um pigmento que tenha um baixo potencial oxidativo, e a capacidade de fazer uma pigmentação seletiva e efetiva da MLI e/ou da MER. (17)

Recentemente, o uso de corantes naturais foram sugeridos como coadjuvantes na visualização das estruturas pré-retinianas e membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, blueberries, fruto do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das características das antocianinas é seu efeito antioxidante natural. (18, 19)

As antocianinas extraídas do fruto do açaí quando ajustadas a uma concentração de 0,5%, um PH de 7,06 e uma osmolaridade de 304mOsm resultaram em uma solução de coloração roxa. Ao ser testada durante cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI que revelou uma pigmentação arroxeada. (20)

Portanto, existem estudos recentes que demonstraram a viabilidade clínica do uso das antocianinas provenientes do fruto do açaí (Euterpe orelacea) para se corar de maneira efetiva as estruturas pré-retinianas e membranas em cirurgia vitreoretiniana em olhos humanos cadavéricos. (20) (21) O presente estudo avaliará a possível toxicidade de diversas concentrações de antocianinas desse fruto em coelhos, sendo de grande interesse para a cirurgia vitreoretiniana atual. A consequência desse estudo será gerar uma base para o desenvolvimento de um corante originado de um fruto nacional e que ainda não foi descrito na literatura durante a cromovitrectomia em olhos humanos. Além disso, sua patente já está protocolada na forma de Depósito de Pedido Nacional de Patente sob no P11000244-8 A2 no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) com sessão de direitos para a Universidade Federal de São Paulo.

INFORMAÇÃO SOBRE ANIMAIS E CRONOGRAMA

ANIMAIS: Serão utilizados:

38 coelhos, machos, com 2Kg

PROCEDÊNCIA: Fazenda Angolana

MANUTENÇÃO: CEDEME

VIGÊNCIA DO ESTUDO: início previsto para: jan/2014 com término previsto para: dez/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 23/01/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



auditoria dos órgãos competentes.

4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo 3. Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliar a aplicabilidade do corante composto pelas antocianinas e proantocianidinas do fruto do Açaí (Euterpe orelacea) em cromovitrectomia em humanos

Pesquisador: Rafael Ramos Caiado

Área Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 2

CAAE: 22208713.3.0000.5505

Instituição Proponente: Departamento de Oftalmologia

Patrocinador Principal: Universidade Federal de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 496.833

Data da Relatoria: 20/12/2013

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de resposta de pendência apontada no parecer 482.016

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência apontada no parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

QUANTO AO TCLE: Deve estar descrito que uma via deverá ficar com o pesquisador e outra com o

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 496.833

participante. Todas as páginas do TCLE deverão estar numeradas (ex: 1/4, 2/4,) e devem ser rubricadas pelo pesquisador principal e participante no momento da aplicação do TCLE. O TCLE deverá estar em papel timbrado do departamento e instituição atualizada)

resposta: nova versão de TCLE foi apresentada atendendo as solicitações do parecer inicial. - pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

SAO PAULO, 17 de Dezembro de 2013

Assinador por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

Anexo 4. Parecer Consubstanciado da CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliar a aplicabilidade do corante composto pelas antocianinas e proantocianidinas do fruto do Açaí (*Euterpe orelacea*) em cromovitrectomia em humanos

Pesquisador: Rafael Ramos Caiado

Área Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 5

CAAE: 22208713.3.0000.5505

Instituição Proponente: Departamento de Oftalmologia

Patrocinador Principal: Universidade Federal de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.139.211

Data da Relatoria: 27/05/2015

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A cirurgia vitreoretiniana é uma cirurgia que envolve técnicas complexas e delicadas que tratam doenças como buraco macular (BM), membrana epirretiniana (MER) e o edema macular diabético. A cromovitrectomia é uma técnica que inclui o uso de corantes compostos de pigmentos vitais ou cristais para melhorar a visualização durante a cirurgia de vitrectomia. Uma boa impregnação do corante favorece o resultado cirúrgico por que facilita procedimentos como a remoção cirúrgica da membrana limitante interna (MLI) e da membrana epirretiniana (MER), além da remoção vítrea completa. Corantes são compostos químicos que se agregam a várias substâncias in natura para produzir cor. Quando os corantes coram tecidos ou células vivas, são chamados de corantes vitais. Em cirurgia vitreoretiniana, o emprego da indocianina verde (ICG) e o azul brilhante G (BBG) facilitam a visualização e a remoção de membranas pre-retinianas. A ICG tem importante papel como pioneira para remoção da membrana limitante interna (MLI). Porém, devido seu conhecido perfil de toxicidade, a recomendação atual para cromovitrectomia é a não utilização da ICG, especialmente na cirurgia de buraco macular. O BBG é um corante sintético que foi certificado como corante alimentar na Europa e pode ser usado como marcador cardiovascular e de proteínas em doenças neurológica. Dados sobre a utilização de BBG para cromovitrectomia e cirurgia de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

catarata foram primeiramente publicados em 2006. O perfil de segurança do BBG foi investigado por alguns autores em experimentos pré-clínicos em ratos e primatas e não foram observadas alterações patológicas à microscopia óptica ou eletrônica em pequenas doses injetadas de BBG. O acompanhamento de longo prazo não foram observados sinais de toxicidade. Apesar da boa afinidade do BBG pela membrana limitante interna (MLI) em olhos humanos, a migração inadvertida sub-retiniana do corante em um procedimento de remoção da MLI resultou em $\zeta++$.

D efeitos em janela ζ na angiofluoresceinografia sugerindo anormalidades atróficas do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR). (16) Até o momento não há um corante estabelecido como ideal para ser utilizado em cirurgias vitreoretinianas. A busca de um corante ideal é baseada em um pigmento que tenha um baixo potencial oxidativo, e a capacidade de fazer uma pigmentação seletiva e efetiva da MLI e/ou da MER, bem como ser capaz de se depositar sobre a hialoide posterior. (17) Recentemente, o uso de corantes naturais foram sugeridos como coadjuvantes na visualização das estruturas pré-retinianas e membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, blueberries, fruto do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das característica das antocianinas é seu efeito antioxidante natural. (18, 19) As antocianinas extraídas do fruto do açaí quando ajustadas a uma concentração de 0,5%, um PH de 7,06 e uma osmolaridade de 304mOsm resultaram em uma solução de coloração roxa. (20) Ao ser testada durante cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI que revelou uma pigmentação arroxeada. (21) Portanto, existem estudos recentes que ressaltam a importância e a viabilidade clínica do uso das antocianinas provenientes do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) para se corar de maneira efetiva as estruturas pré-retinianas e membranas em cirurgia vitreoretiniana em olhos humanos cadavéricos. (20, 21) A patente do uso intraocular das antocianinas do fruto do açaí já foi depositada como pedido nacional de Patente sob nº P11000244-8 A2 no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) com cessão de direitos para a Universidade Federal de São Paulo.

Hipótese:

Desfecho Primário: Eficácia do tingimento do corante nas concentrações de 0,5 mg/ml nas estruturas investigadas. **Desfecho Secundário:** Ausência de toxicidade ou outros efeitos adversos relacionados ao uso do corante bem como melhora da acuidade visual.

Metodologia:

Vinte e cinco pacientes com diagnóstico de membrana epirretiniana, buraco macular, retinopatia

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

diabética com ou sem hemorragia vítrea e/ou edema macular e/ou tração vitreomacular associado a indicação de cirurgia de vitrectomia seguido da remoção da membrana epirretiniana e/ou membrana limitante interna serão selecionados para participar do presente estudo. Após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-UNIFESP), todos os pacientes deverão compreender e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da realização da cirurgia. Os pacientes atendidos no setor de Retina do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP com diagnóstico de membrana epirretiniana, buraco macular ou retinopatia diabética proliferativa com indicação de cirurgia pela técnica de vitrectomia posterior via pars plana para remoção da membrana epirretiniana e/ou membrana limitante interna, serão convidados a participar deste estudo. Todos os pacientes serão operados pela técnica de vitrectomia padrão utilizando-se 4 esclerotomias e sistema de 23-gauge com iluminação acessória. Todos receberão o corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (*Euterpe oleracea*) para corar a membrana epirretiniana e a membrana limitante interna e identificação do vítreo (hialóide posterior). Os pacientes serão seguidos por um período mínimo de 30 dias e cada consulta consistirá de exame oftalmológico conforme descrito acima e, na consulta de 30 dias, os exames complementares supra-citados serão repetidos.

Critérios de Inclusão/ Exclusão:

Critérios de inclusão:

Pacientes maiores de 18 anos, ambos os sexos- diagnóstico de membrana epirretiniana, buraco macular ou retinopatia diabética proliferativa com ou sem hemorragia vítrea.- indicação de tratamento cirúrgico para remoção da membrana epirretiniana (com ou sem remoção da membrana limitante interna subjacente), remoção da membrana limitante interna e em retinopatia diabética com ou sem hemorragia vítrea.

Critérios de Exclusão:

Antecedente de qualquer doença ocular - Glaucoma - Qualquer infecção ocular previa modificando a anatomia ocular.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar a viabilidade e segurança do uso do corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (*Euterpe oleracea*) nas concentrações de 0,1 mg/ml e 5 mg/ml em humanos que apresentam a indicação cirúrgica para cromovitrectomia. Será investigada

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

a capacidade de impregnação do corante no hialóide posterior, da membrana epirretiniana e da membrana limitante interna.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Toxicidade do corante. Esse risco será minimizado pelo fato de já haver estudos anteriores em laboratório que não evidenciaram toxicidade. Dentre esses estudos, temos estudo de olhos cadavéricos, perfil de toxicidade retiniana em coelhos e cultura de células.

Benefícios:

Possibilidade de maior perfil de segurança durante o procedimento cirúrgico e altos níveis de sucesso terapêutico devido a propriedades antioxidantes e boa capacidade de tingimento dos tecidos com baixo risco de toxicidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

RECURSO ÀS PENDÊNCIAS 1, 2B, 2D, 2F e 2H.

1. Quanto à relação entre benefício esperado e risco da participação no referido protocolo: Conforme a resolução 466/2012 item V.I "As pesquisas envolvendo seres humanos são admissíveis quando: a) o risco se justifique pelo benefício esperado; b) no caso de pesquisas experimentais da área da saúde, o benefício seja maior, ou, no mínimo igual às alternativas já estabelecidas para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento.". O pesquisador faz referência, no protocolo de pesquisa, a estudos em olhos de cadáver. Não cita mais estudos prévios de biossegurança (como aconteceu no caso do corante BBG, por exemplo). Solicita-se que o pesquisador apresente todos os dados das pesquisas desenvolvidas, especificando a

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

fundamentação da fase de pesquisa clínica na qual se realizará o estudo, demonstrando que as fases anteriores já foram cumpridas, em acordo com a resolução 251/97.

RESPOSTA: Não há no momento, um corante estabelecido como ideal para ser utilizado em cirurgias vítreo-retinianas. Atualmente o corante Azul Brilhante tem sido a substância de escolha usado em cirurgias vítreo-retinianas. Porém, o estudo de Rodrigues et al. de 2009 ¹ revelou uma toxicidade seletiva aos fotorreceptores retinianos após injeção intra-vítrea do Azul Brilhante em olhos de coelhos. Um relato de caso (Malerbi et al.) ² descreveu a migração não-intencional de azul brilhante ao espaço sub-retiniano durante uma cromovitrectomia, sendo evidenciado, a anormalidade do Epitélio Pigmentário Retiniano na angiografia. A busca de um corante ideal é baseada em um pigmento que tenha um baixo potencial oxidativo, e a capacidade de fazer uma pigmentação seletiva e efetiva dos tecidos do olho. Recentemente, o uso de corantes naturais foram sugeridos como coadjuvantes na visibilização das estruturas pré-retinianas e membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, blueberries, fruto do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das características das antocianinas é seu efeito antioxidante natural. O estudo atual faz parte de uma linha de pesquisa da Universidade Federal de São Paulo que se iniciou em estudos laboratoriais in vitro (Peris et al. 2013 ³ e Chen et al. 2013 ⁴) e in vivo em coelhos (dados não publicados). Tais estudos incluíram a extração de antocianinas provenientes do fruto do açaí, o teste do uso do corante em olhos cadavéricos e o teste de toxicidade em olhos de coelho. Porém a limitação da técnica em laboratório e em animais requer que o experimento seja realizado em humanos. O estudo de Peris et al (2013) ³, revelou que o corante, quando estabelecido a um pH e osmolaridades fisiológicas (concentração de 0,5%, um pH de 7,06 e uma osmolaridade de 304mOs), resultou em uma solução de coloração roxa, ou seja, viável como corante. Ao ser testada em cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI que revelou uma pigmentação arroxeadas, como mostrado no estudo na Jane Chen de 2013. ⁴ Outro trabalho recente em humanos, que não faz parte da presente linha de pesquisa (Sanchez et al 2009) ⁵, revelou que a polpa do açaí pode ser usada como um agente de contraste oral, natural, seguro, de baixo custo, com alta eficiência e bem aceito pelo paciente em exames de colangiopancreatografia usando ressonância magnética.

1. Rodrigues EB, Penha FM, Farah ME, de Paula Fiod Costa E, Maia M, Dib E, et al. Preclinical investigation of the retinal biocompatibility of six novel vital dyes for chromovitrectomy. Retina. 2009 Apr;29(4):497-510.

2. Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB. Subretinal brilliant blue G migration during internal

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

limiting membrane peeling. The British journal of ophthalmology. 2009;93(12):1687. Epub 2009/11/27.

3. Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira EL, Maia, et al. Color Variation Assay of the Anthocyanins from Acai Fruit (Euterpe oleracea): A Potential New Dye for Vitreoretinal Surgery. Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics. 2013. Epub 2013/07/26.

4. Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves Ferreira RE, de Moraes Filho MN, et al. Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from acai fruit (Euterpe oleracea) and 10 other natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes. Retina. 2013;33(1):89-96. Epub 2012/09/20.

5. Sanchez TA, Elias J, Jr., Colnago LA, de Almeida Troncon LE, de Oliveira RB, Baffa O, et al. Clinical feasibility of Acai (Euterpe oleracea) pulp as an oral contrast agent for magnetic resonance cholangiopancreatography. J Comput Assist Tomogr. 2009 Sep-Oct;33(5):666-71.

ANÁLISE: Os autores citaram como justificativa à busca de novos corantes, entre outros pontos, a toxicidade revelada pelo corante já utilizado em olhos de coelhos. No entanto, os autores não apresentaram dados de toxicidade em olhos de coelhos do corante em estudo. A falta desses dados pode submeter os participantes de pesquisa a riscos não aceitáveis. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RECURSO: Os dados de toxicidade do uso do corante em olhos de coelhos está apresentado em documento anexo (ANEXO 1). Resultados mostram que o uso do corante investigado é seguro no ponto de vista de toxicidade em coelhos.

ANÁLISE DO RECURSO: Embora os pesquisadores afirmem haver um "anexo 1" onde supostamente estariam os dados sobre toxicidade em coelhos, não há tal documento na plataforma. Entretanto, procurando entre os que há, encontra-se o documento Relatório toxicidade 21.04.15.pdf. Neste documento há os dados de toxicidade em coelhos. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão 3, datado de 09/12/2013:

a) Na página 1 de 4 lê-se: "Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar a viabilidade e segurança do uso do corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (Euterpe oleracea) nas concentrações de 0,1mg/ml e 5 mg/ml em humanos que apresentam a indicação cirúrgica para cromovitrectomia.". O documento de consentimento deve seguir a terminologia da Resolução CNS 466/2012, item IV, e ser apresentado ao participante da pesquisa em forma de convite. Cabe ao pesquisador informar

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

todos os procedimentos do estudo e as garantias do participante da pesquisa para, ao final, solicitar sua anuência. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: O documento de consentimento foi totalmente modificado para seguir a terminologia da Resolução CNS 466 de 2012. O texto foi modificado para ser apresentado ao participante da pesquisa em forma de convite. Para facilitar o entendimento do paciente voluntário separamos o texto nos seguintes itens:

- I. Título da Pesquisa
 - II. Justificativa
 - III. Procedimentos
 - IV. Inclusão de Grupo controle ou placebos
 - V. Métodos alternativos para Obtenção da Informação ou Tratamento da Condição
 - VI. Desconfortos ou Riscos Esperados e Assistência
 - VII. Descrição dos Benefícios ou Vantagens Diretas ao Voluntário
 - VIII. Forma de Acompanhamento e Assistência ao Sujeito
 - IX. Forma de Contato com os Pesquisadores e com o CEP
 - X. Garantia de Esclarecimento
 - XI. Garantia de Recusa à Participação ou Saída do Estudo
 - XII. Garantia de Sigilo
 - XIII. Garantia de Ressarcimento e Indenização
 - XIV. Garantia de Entrega de Cópias
- ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

b) De acordo com o item IV-1-b da Resolução CNS 466/12, o TCLE deve "prestar informações em linguagem clara e acessível, utilizando-se das estratégias mais apropriadas à cultura, faixa etária, condição socioeconômica e autonomia dos convidados a participar da pesquisa.". O TCLE apresentado contém vários termos técnicos de difícil compreensão ao leigo. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Para tornar a linguagem apresentada no TCLE mais clara e acessível substituímos diversos termos técnicos por termos mais populares. Por exemplo, o termo "midríase medicamentosa" foi substituída por dilatação pupilar.

ANÁLISE: O TCLE continua com vários termos de difícil compreensão a um leigo. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA

RECURSO: Novas modificações foram realizadas em todo o texto do TCLE para tornar a sua linguagem mais acessível ao paciente.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

ANÁLISE DO RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

c) Na página 01 de 04, lê-se: "A introdução do corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (experimental) ocorrerá durante a cirurgia de retina que será realizada de forma rotineira, com a remoção do Gel vítreo e de eventuais estruturas correspondentes à causa da doença abordada. Dessa forma, não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que o corante em questão, permite melhor visibilização dessas estruturas, SEM OFERECER EFEITOS COLATERAIS."(Destaque nosso). Da forma como a hipótese a ser testada foi apresentada dá a entender que não há risco de efeito colateral, o que não é verdade. Solicita-se correção.

RESPOSTA: Os procedimentos e os riscos de efeito colateral foram detalhadamente explicados no texto do TCLE sob os subtítulos: III – Procedimentos; VI- Desconfortos ou Riscos Esperados e Assistência

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

d) Na página 2 de 4, lê-se: "Ao término da cirurgia, todos os pacientes RECEBERÃO UMA RECEITA MÉDICA com colírio de associação de antibiótico com corticoide, seguindo a rotina de cirurgia de vitrectomia, durante as semanas seguintes do pós-operatório." (Destaque nosso). Como a medicação pós-operatória faz parte do estudo, não é aceitável que os participantes tenham despesas com tal medicação, que deve ser fornecida pelo patrocinador, em acordo com o item IV-3-g da Resolução CNS 466/12. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Não haverá despesas pessoais para o paciente em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, além do custo de deslocamento do paciente para essas etapas do estudo.

Essa informação foi agora introduzida sob o subtítulo:

VII. Descrição dos Benefícios ou Vantagens Diretas ao Voluntário

ANÁLISE: O trecho apresentado foi: "não haverá despesas pessoais [...] ALÉM DO CUSTO DE DESLOCAMENTO [...]" (destaque nosso). No entanto, da forma como o trecho foi redigido entende-se que o gasto de transporte dar-se-á por conta do participante de pesquisa. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RECURSO: O Trecho destacado acima (página 6/9) foi modificado para:

"Não haverá despesas pessoais para o paciente e seu acompanhante, em qualquer fase do estudo, incluindo exames, consultas, custos de alimentação e deslocamento durante essas etapas do estudo."

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

ANÁLISE DO RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

e) Na página 2 de 4 lê-se: "Posteriormente serão realizados exames para documentação e análise dos resultados, como a Retinografia e Angiofluoresceinografia. Os efeitos adversos referente ao exame de angiofluoresceinografia incluem náusea, vômitos, rubor da pele, coceira, urticária e espirros em excesso. Problemas raros incluem desmaio, edema de laringe, brocoespasmo e choque anafilático. Quase todos pacientes apresentam alteração na coloração da pele e da urina, sem qualquer outra intercorrência. Os demais exames oftalmológicos: acuidade visual, eletrorretinografia, tomografia de coerência óptica e microperimetria não são invasivos, não utilizam radiação e não apresentam efeitos adversos.". Não há o detalhamento dos procedimentos, incluindo o tempo que se estima gastar para sua realização. Não há menção ao fato de que alguns dos exames não são realizados rotineiramente no pós-operatório, e que serão realizados exclusivamente com fins a fornecer dados à pesquisa. E especificamente no caso da eletrorretinografia, não é verdade que "não apresenta efeito adverso", pois necessita de dilatação das pupilas e uso de eletrodo de lente de contato, que podem causar desconforto e apresentam riscos, ainda que de frequência baixa. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Todas as informações acima descritas foram acrescentadas ao TCLE sob os subtítulos de: III. Procedimentos e VI. Desconfortos ou Riscos Esperados e Assistência.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

f) Não é informado que está garantido o ressarcimento de gastos relacionados ao estudo. Cabe ressaltar que, como prevê o item IV.3."g" da Resolução CNS 466/2012, deve ser garantido ao participante de pesquisa (e a seu acompanhante, se for o caso) o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Assim sendo, solicita-se que a garantia de ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo seja apresentada de modo claro e afirmativo.

RESPOSTA: Incluímos as informações acima descritas no texto do TCLE sob o subtítulo:

VII. Descrição dos Benefícios ou Vantagens Diretas ao Voluntário

ANÁLISE: O trecho apresentado foi: "não haverá despesas pessoais [...] ALÉM DO CUSTO DE DESLOCAMENTO [...]" (destaque nosso). No entanto, da forma como o trecho foi redigido entende-se que o gasto de transporte dar-se-á por conta do participante de pesquisa. PENDÊNCIA NÃO

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

ATENDIDA.

RECURSO: O Trecho destacado acima (página 6/9) foi modificado para:

"Não haverá despesas pessoais para o paciente e seu acompanhante, em qualquer fase do estudo, incluindo exames, consultas, custos de alimentação e deslocamento durante essas etapas do estudo."

ANÁLISE DE RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA

g) Na página 2 de 4, lê-se: "As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente incluindo o Sr.(a)". Considerando que os dados pessoais serão identificados, solicita-se que sejam indicados os procedimentos que garantam sigilo, confidencialidade e segurança no tratamento dos dados (Resolução CNS 466/2012, item III.2.i e IV.3.e). RESPOSTA: Incluímos as informações acima descritas no texto do TCLE sob o subtítulo: XII. Garantia de Sigilo. Os pesquisadores asseguram a privacidade do sujeito quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Para isso, cada paciente será identificado com uma numeração a fim de resguardar seu dados pessoais durante a pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

h) Na página 3 de 4, lê-se: "Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. Os pesquisadores responsáveis se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.". Cabe ressaltar que a responsabilidade pela prestação de cuidados integrais de saúde pelo tempo que for necessário para o tratamento por lesões não pode estar vinculada à comprovação de relação direta com a participação no estudo, devido à própria dificuldade prática em comprovar esse vínculo. Assim sendo, danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer da participação no estudo, devem ser acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu patrocinador mesmo que não seja estabelecido nexo causal. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: O texto foi modificado sob o subtítulo: VIII. Forma de Acompanhamento e Assistência ao Sujeito

ANÁLISE: O trecho apresentado (a seguir) não evidencia a garantia de assistência integral e gratuita: "Em caso de dano pessoal, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

da participação no estudo, serão acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu patrocinador na própria instituição". PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

RECURSO: O trecho citado acima (página 7/9) foi modificado para atender a garantia de assistência integral e gratuita ao paciente:

"Em caso de dano pessoal, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer da participação no estudo, os pacientes envolvidos no estudo receberão assistência integral e gratuita e serão acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu orientador na própria instituição."

ANÁLISE DE RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

i) Na página 3 de 4, lê-se: "Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Rafael Ramos Caiado, CPF-864.010.501-44, que pode ser encontrado no endereço: Rua Botucatu 822 Vila Clementina São Paulo SP, tel 5085-2087. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Rua Botucatu, 572 - 1º andar cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 E-mail: cepunifesp@epm.br.". Solicita-se que sejam incluídos no TCLE: uma breve descrição do que é o CEP, qual sua função no estudo e seu horário de funcionamento. Solicita-se ainda a inclusão da forma de contato com o pesquisador em caso de urgência/emergência.

RESPOSTA: O texto foi modificado sob o subtítulo: IX. Forma de Contato com os Pesquisadores e com o CEP.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

j) Na última página do TCLE, lê-se: "Em casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.". Tal afirmação está incoerente com os critérios de inclusão, que preveem apenas maiores de 18 anos de idade. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: A afirmação foi removida e o texto adequado para os critérios de inclusão.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

k) O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apondo sua assinatura na última página do referido Termo. O pesquisador responsável, ou membro da equipe delegada pelo pesquisador responsável, deverá, da mesma forma, rubricar todas as folhas do TCLE, apondo sua

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 1.139.211

assinatura na última página do referido Termo. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: As observações acima serão seguidas no ato das assinaturas do TCLE, como sugerido.

Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

BRASILIA, 10 de Julho de 2015

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Bibliografia consultada

Normas para teses e dissertações [Internet]. 2ª ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos; 2015 [cited Year Month Day]. Available from: <http://www.bibliotecacsp.sites.unifesp.br/images/doc/normas-para-teses-e-dissertacoes.pdf>